



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ADRIANA LOPES SCHIOZER

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTUDO DA ESTABILIDADE E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Arrabidaea chica* VERLOT.**

**CAMPINAS
2017**

ADRIANA LOPES SCHIOZER

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESTUDO DA ESTABILIDADE E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Arrabidaea chica* VERLOT.**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata
Coorientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ADRIANA LOPES SCHIOZER ORIENTADA PELO PROF. DR. LAURO EUCLIDES
SOARES BARATA**

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Sch34c Schiozer, Adriana Lopes, 1968-
Caracterização química, estudo da estabilidade e atividade biológica de extratos das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot / Adriana Lopes Schiozer. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata.

Coorientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Arrabidaea chica*. 2. Desoxiantocianidina. 3. Impressão digital. 4. Atividade biológica. 5. Quimiometria. I. Barata, Lauro Euclides Soares, 1942-. II. Poppi, Ronei Jesus, 1961-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chemical characterization, stability study and biological activity of extracts of *Arrabidaea chica* Verlot

Palavras-chave em inglês:

Arrabidaea chica

Desoxiantocianidin

Fingerprinting

Biological activity

Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Lauro Euclides Soares Barata [Orientador]

Fernando Batista da Costa

Marcia Ortiz Mayo Marques

Vera Lucia Garcia

Adilson Sartoratto

Data de defesa: 22-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata (Orientador)

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa (FCFRP-USP-Ribeirão Preto)

Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques (IAC)

Profa. Dra. Vera Lucia Garcia (CPQBA / Unicamp)

Prof. Dr. Adilson Sartoratto (CPQBA-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **ADRIANA LOPES SCHIOZER**, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de agosto de 2017.

Dedico esta tese aos meus filhos que eu tanto amo:
Lígia e Rubens

“Nature does nothing without purpose or uselessly”

Aristóteles

384 a.c. a 322 a.c.

*“The scientist does not study nature because it is useful,
he studies it **because he delights in it,**
and he delights in it **because it is beautiful**”*

Jules Henri Poincaré

1854 - 1912

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Lauro E. S. Barata pela amizade, confiança e paciência.

Agradeço ao Prof Dr. Ronei Poppi e à Profa. Dra. Susanne Rath pelo apoio em aspectos importantes deste trabalho.

Ao longo da minha pesquisa, algumas colaborações foram muito preciosas. Agradeço a eles:

- Prof. Dr. Ronei Poppi e ex-alunos Paulo Março e Luiz Godoy, lab. de quimiometria em química analítica, Instituto de Química-Unicamp.

- Prof. Dr. Marcos Eberlin e ex-alunos Elaine Cabral e Rodrigo Catharino, Lab. Espectrometria de Massas Thomson, Instituto de Química-Unicamp.

- Prof. Dra. Maria Izabel Bueno e ex-aluna Karen Goraieb, lab. de fluorescência de raios-x aliada à quimiometria, Instituto de Química-Unicamp.

- Prof. Dr. Theo Kieckbusch e ex-aluno Uiram Kopcak, lab. de engenharia de processos, faculdade de Engenharia Química-Unicamp.

- Prof. Dra. Angélica Schreiber e Luzia Lyra, lab. de Microbiologia em Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp.

- Prof. Dr. Adrian Pohlit, lab. de Princípios Ativos do Departamento de Produtos Naturais, INPA, Manaus-AM.

Aos alunos de iniciação científica e amigos de laboratório: Alice Braga, Raquel Fujimoto, Wyllerson Gomes, Nathália Becker, Eva Souza, Fernanda Lupe e Júlio Cesar Silva.

Aos técnicos Ricardo Pereira e Cláudia Martelli pela incansável ajuda na realização dos experimentos.

Agradeço aos meus pais (*in memorium*) pelo exemplo de vida que me passaram. Aos meus filhos que amo incondicionalmente. Aos meus irmãos, cunhada e queridos sobrinhos pelo carinho de sempre. Ao meu amado namorado Edson Manzano pela força e companheirismo de todos os dias. Amo muito todos vocês.

E por fim um especial agradecimento a minha amiga, irmã e conselheira Rita Zaccardi de Souza pela amizade e apoio imensuráveis do início ao fim deste trabalho.

RESUMO

O foco deste trabalho foi o estudo da planta *Arrabidaea chica* Verlot conhecida na Amazônia pelas propriedades tintoriais, medicinais e cosméticas. As diferentes variedades botânicas desta planta herbácea de diferentes composições químicas apresentam diferentes propriedades farmacológicas e empresas utilizam indistintamente extratos da planta em produtos comercializados. Foram desenvolvidas metodologias de extrações das folhas da *A. chica* cujos extratos foram caracterizados pelos marcadores químicos incomuns, as 3-desoxiantocianidinas. Utilizou-se nas extrações técnicas de partição, como as técnicas de SPE e fluido supercrítico e nas caracterizações técnicas de HPLC, espectrometria de massa e fluorescência de raios-x com auxílio de análise de componentes principais (PCA). Assim foi possível definir plantas de diferentes variedades botânicas e a influência da sazonalidade na produção das 3-desoxiantocianidinas. Extratos foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana em *Trychophyton spp.* encontrando-se acentuada atividade nestas cepas. As atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes foram verificadas mostrando que o extrato rico em desoxiantocianidinas teve efeito tópico mais importante que o da substância isolada, sugerindo um efeito sinérgico. Foi investigada a influência da radiação e pH no comportamento cinético das desoxiantocianinas através de métodos quimiométricos e PCA. Através do sistema de equilíbrio proposto, verificou-se que o extrato rico em desoxiantocianidinas apresentou alta estabilidade quando comparado a extratos contendo padrões de antocianinas e com isso mostraram um potencial uso como pigmentos em alimentos ou cosméticos. Extratos das folhas da *A. chica* foram avaliados frente a diferentes atividades biológicas e os resultados contribuem para a potencial utilização dos extratos em aplicações nas áreas de fitomedicina e cosméticos.

ABSTRACT

The focus of this work was the study of the *Arrabidaea chica* Verlot plant commonly used in Amazonia for the colorant, medicinal and cosmetic properties. The different botanical varieties of this herbaceous plant of different chemical compositions present different pharmacological properties and the industry is using indistinctly the plant extracts in commercial products. Extraction methodologies were developed to produce extracts concentrated on the leaves of *A. chica*, they were characterized using the uncommon chemical markers, the 3-desoxianthocyanidins. In the extraction it was used partition techniques, SPE and supercritical fluid. In the characterization it was used HPLC, mass spectrometry and x-ray fluorescence combined with principle component analysis (PCA). This way, it was possible to discriminate the different botanical varieties and the seasonal influence in the production of the 3-desoxianthocyanidins. Extracts were evaluated according to their antimicrobial activity on *Trychophyton spp.* and an important activity was found using those strains. The anti-inflammatory and healing activities were checked and the result was that the extract rich in desoxianthocyanidins presented a topic effect more important than the isolated substance, suggesting a synergetic effect. Additionally the influence of the radiation and pH on the kinetics behavior on the desoxianthocyanins was investigated using chemometric methods and PCA. From the proposed equilibrium system we have that the extract rich in desoxyanthocianidins presented higher stability when compared to extracts containing anthocyanins resulting in a potential use of the pigment in food and cosmetics. The leaves extracts from *A. chica* were evaluated for different biological activities and the results contribute to the potential use of the extracts in applications in the areas of phytomedicine and cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da obtenção de fitomedicamento/fitofármaco a partir de partes de uma planta.....	22
Figura 2. <i>Arrabidaea chica</i> da foto é conhecida como tipo/variedade I. Foto obtida em Campinas, SP.	25
Figura 3. Antocianidinas comumente encontradas na natureza e comprimento máximo de absorção no UV-VIS.....	32
Figura 4. 3-Desoxiantocianidinas encontradas em plantas inferiores.....	33
Figura 5. 3-Desoxiantocianidinas e flavonas isoladas da <i>A. chica</i>	35
Figura 6. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.....	37
Figura 7. Arranjo de dados tridimensional e sua decomposição por MPCA e equação utilizada para representar a decomposição por MPCA.	41
Figura 8. HPLC-MS/MS do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas (3DAE) obtido das folhas da <i>A. chica</i> . (S-1) m/z 301→286, (S-2) m/z 285→270 e (S-3) m/z 299→284.	61
Figura 9. ESI-MS do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas (3DAE) obtido das folhas da <i>A. chica</i> . S-1 de m/z 301,0, S-2 de m/z 285,1 e S-3 de m/z 299,1.....	62
Figura 10. ESI(+)-MS/MS de S-1 , m/z 301.1, S-2 , m/z 285.1 e S-3 , m/z 299.1.....	63
Figura 11. Proposta de fragmentação para S-1 , S-2 e S-3	64
Figura 12. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da S-3 (m/z 299).....	66
Figura 13. Folhas frescas da <i>A.chica</i> , variedades I (AC1), II (AC2) e III (AC3).....	68
Figura 14. Espectros de massa representativos de ESI(+) das variedades I, II e III da <i>A. chica</i>	71
Figura 15. Gráficos gerados utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir de ESI(+)-MS de extratos de 3 variedades de <i>A. chica</i> . A, B e C são os gráficos para amostras das variedades I, II e III respectivamente.	78
Figura 16. Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e galho da <i>A. chica</i>	82
Figura 17. Gráfico de <i>loadings</i> para a região entre 0 e 42 keV para as amostras de folhas e galho da <i>A. chica</i>	82

Figura 18. Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e separados conforme a estação em que as folhas foram colhidas (estação chuvosa e seca).....	83
Figura 19. Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e separados por período do dia em que as folhas foram colhidas (início da manhã, meio dia ou fim da tarde).....	84
Figura 20. Gráfico de <i>scores</i> da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas, classificadas conforme sua variedade (I, II ou III).....	85
Figura 21. Gráfico de <i>loadings</i> para a região entre 0 e 42 keV para as amostras de folhas da <i>A. chica</i> , separados variedade (I, II ou III).....	85
Figura 22. Espectros sobrepostos das amostras da Tabela 7	86
Figura 23. Esquema do equipamento experimental utilizado. E é o extrator onde são colocadas as folhas moídas. C a coluna de sílica.	91
Figura 24. Perfis XIC para os extratos Hex (A), DCL (B) e EtOAc (C). S-1 refere-se a <i>m/z</i> 301 e seus isômeros; S-2 a <i>m/z</i> 285, S-3 a <i>m/z</i> 299, 5 a <i>m/z</i> 315.	106
Figura 25. Transformação estrutural da S-3 , carajurina, em meio ácido. Onde AH ⁺ é o cátion flavílico, A é a anidrobases quinoidal, B é a pseudo base carbinol, Cc a cis-chalcona e Ct a trans-chalcona.	117
Figura 26. MPCA para matrizes referentes a dados de S-3 diluídos em diferentes soluções de pH (1, 4, 7, 10 e 12) no escuro (e) e com exposição à radiação UV.	120
Figura 27. Espectros recuperados e perfil cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de S-3 diluído em soluções de pH com e sem radiação UV. a) pH 1 sob radiação UV, b) pH 1 na ausência de radiação, c) pH 4 sob radiação UV, b) pH 4 na ausência de radiação, e) pH 7 sob radiação UV, f) pH 7 na ausência de radiação, g) pH 10 sob radiação UV, h) pH 10 na ausência de radiação, i) pH 12 sob radiação UV, j) pH 12 na ausência de radiação. Cada espectro (linhas pontilhadas e cheias) representam substâncias previstas por análise quimiométrica.	123
Figura 28. MPCA para matrizes referentes a dados de extrato bruto etanólico no escuro (e) e com exposição a radiação UV.....	126
Figura 29. Espectros e perfil cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados do extrato etanólico (EtOH-dry) diluído em diferentes soluções de pH com e sem radiação UV. a) pH 1 sob radiação UV, b) pH 1 na ausência	

de radiação, c) pH 4 sob radiação UV, d) pH 4 na ausência de radiação, e) pH 7 sob radiação UV, f) pH 7 na ausência de radiação, g) pH 10 sob radiação UV, h) pH 10 na ausência de radiação, i) pH 12 sob radiação UV, j) pH 12 na ausência de radiação. Cada espectro (linhas verdes e azuis) representam substâncias previstas por análise quimiométrica.	128
Figura 30. Efeito da radiação e pH na estabilidade de S-3 . Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.	130
Figura 31. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato EtOH-dry. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.	133
Figura 32. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato diclorometano, DCM. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.	136
Figura 33. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato 3DAE. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados cromatográficos e espectrais de S-1, S-2 e S-3	65
Tabela 2. Amostras das folhas analisadas em função da estação e período de coleta.	68
Tabela 3. Sinais de intensidade de espectros de massas para os extratos das folhas de <i>A. chica</i> coletadas em diferentes horários do dia e diferentes épocas do ano.	72
Tabela 4. Dados de 101 íons <i>m/z</i> e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade I. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a Figura 15 . Gráficos gerados utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir de ESI(+)-MS de extratos de 3 variedades de <i>A. chica</i> . A, B e C são os gráficos para amostras das variedades I, II e III respectivamente	74
Tabela 5. Dados de 101 íons <i>m/z</i> e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade II. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a Figura 15B	75
Tabela 6. Dados de 101 íons <i>m/z</i> e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade III. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base	

foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a Figura 15C .	76
Tabela 7. Amostras analisadas utilizando fluorescência de raio-X.	80
Tabela 8. Dados de fluorescência de raios-X dos principais picos de algumas amostras de folhas e de galho da <i>A. chica</i> provenientes dos estados de AM, PR, PA e SP.	87
Tabela 9. Amostras padronizadas utilizadas para calibração e seus níveis de ferro.	88
Tabela 10. Atividades iniciais para extratos das folhas da <i>A. chica</i> frente a cepas padrões.	102
Tabela 11. Resultados de MICs e MFCs das frações mais ativas das folhas da <i>A. chica</i> frente a cepas clínicas de dermatófitos.	104
Tabela 12. Resultados de MIC e MFC para frações das folhas da <i>A. chica</i> e drogas comerciais frente a cepas de demartófitos.	105
Tabela 13. Dados cromatográficos para as 3-desoxiantocianidinas encontradas em frações com atividade antimicrobiana das folhas da <i>A. chica</i> .	107
Tabela 14. Soluções tampão preparadas para os valores de pH 1, 4, 7, 10 e 12.	115
Tabela 15. Número de componentes principais (PCs) necessários para explicar 100% da variância dos dados para cada valor de pH para S-3 sem e com exposição à radiação ultravioleta.	124
Tabela 16. Número de componentes principais (PCs) necessários para explicar 100% da variância dos dados para cada valor de pH para o extrato etanólico (EtOH-dry) sem e com exposição à radiação ultravioleta.	129
Tabela 17. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para S-3 .	131
Tabela 18. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato etanólico EtOH-dry.	134
Tabela 19. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato diclorometano, DCM.	137
Tabela 20. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas, 3DAE.	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3DAE - Extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas encontradas nas folhas da *Arrabidaea chica*

3DAE-dil - Extrato 3DAE diluído em DMSO

A - Amostras colhidas no fim de tarde

A - Anidrobases quinoidais

A- - Quinoidal ionizada

AC1 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica*, variedade I

AC2 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica*, variedade II

AC3 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica*, variedade III

AH⁺ - Cátion flavílico

AM1 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente da Amazônia, variedade I

AM2 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente da Amazônia, variedade II

AM3 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente da Amazônia, variedade III

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B - Pseudobase carbinol

C_C - *Cis*-chalcona

CCD - Cromatografia de camada delgada

CID - Dissociação induzida por colisão, *collision induced dissociation* em inglês

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, métodos de referência para diluição em caldo de leveduras e fungos filamentosos

CNTP - Condições Normais de Temperatura e Pressão

C_t - *trans*-chalcona

D - Colheita na estação seca, *Dry* em inglês

DCL-dil - Extrato diclorometânico diluído em DMSO

DCL-dry - Extrato diclorometânico seco

DCM - Extrato diclorometano

DI₅₀ - Dose que inibe 50% do edema

DMSO - Dimetil sulfóxido

EDXRF - Fluorescência de raios-X por dispersão de energia, *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence* em inglês

ESI - Fonte de eletronebulização, *electrospray ionization* em inglês

ESI-MS/MS - Ionização por electrospray associada a um detector sequencial de massas

EtOAc-dil - Extrato acetato de etila diluído em DMSO

EtOH-dry - Extrato etanólico seco

FA - *análise de fatores*, *factor analysis* em inglês

FDA - Administração de alimentos e drogas dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* em inglês

FRX - Fluorescência de Raios-X por dispersão de energia

Hex-dil - Extrato hexânico diluído em DMSO

Hex-dry - Extrato hexânico seco

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector de arranjo de fotodiodos

HSCCC - Cromatografia em contra corrente de alta velocidade

Imáx - Inibição máxima do edema de orelha

K - constante de velocidade de degradação de primeira ordem

L - Amostras colhidas no meio do dia

LC-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector sequencial de massas

M - Amostras colhidas no início da manhã

MCR - Resolução de Curvas Multivariadas

MCR-ALS - Método de resolução curvas multivariadas com os quadrados mínimos alternados

MFC - Concentração Fúngica Mínima

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MPCA - Análise de Componentes Principais Multi-modo

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas, *multiple reaction monitoring* em inglês

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio; Sigma

NIST- Instituto nacional de padrões e tecnologia, *National Institute of Standards & Technology*, em inglês

NR - Vermelho neutro, cloridrato de amino-*m*-dimetilamino-2-metil-fenazina

NRU - Captação de vermelho neutro

PA3 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente do Pará, variedade III

PC - Componentes principais, *Principal components* em inglês

PCA - Análise dos Componentes Principais, *Principal Component Analysis* em inglês

PLS-DA - Quadrados Mínimos Parciais, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis* em inglês

PRG1 - Amostra de galhos da *Arrabidaea chica* proveniente do Paraná, variedade I

PR1 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente do Paraná, variedade I

Q-TOF - espectrômetro de massa de alta resolução, quadropolo – tempo de voo

R - Colheita na estação chuvosa, *Rainy* em inglês

Res - Extrato residual seco

Res-dil - Extrato residual diluído em DMSO

Res-dry - Extrato residual seco

S-1 - Substância 1, 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavílio

S-2 - Substância 2, 6,7,4'-triidroxi-5-metoxiflavílio

S-3 - Substância 3, carajurina ou 6,7-diidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio

S-4 - Substância 4, 6,7,3'-triidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio

S-5 - Substância 5, 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavona

S-6 - Substância 6, 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona

SC-3DAE - Extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas obtido por extração com uso de fluido supercrítico

SC-Me - Extrato metanólico obtido por extração com uso de fluido supercrítico

SP1 - Amostra de folhas da *Arrabidaea chica* proveniente de São Paulo, variedade I

SPE - Extração em fase sólida

SRM - Material de referência padrão, *Standard Reference Material, National Institute of Standards & Technology* em inglês

SVD - *Singular Value Decomposition*

$t_{1/2}$ - Tempo de meia vida

UPLC ou CLUE - cromatografia líquida de ultra eficiência, *ultra performance liquid chromatograph* em inglês

UV-Vis - Ultra Violeta Visível

WEPAL - Programas de avaliação para laboratórios analíticos de *Wageningen, Wageningen Evaluating Programs for Analytical Laboratories* em inglês

XIC - Cromatograma de íon extraído, *extracted ion chromatogram* em inglês

CLSI – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais, *Clinical and Laboratory Standards Institute* em inglês

$\lambda_{\max}$ - Comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO, MÉTODOS E OBJETIVOS	20
I.1. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	21
I.2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	22
I.2.1. A importância das plantas medicinais como fontes de novos medicamentos	22
I.2.2. <i>Arrabidaea chica</i> - Informação botânica	24
I.2.3. <i>Arrabidaea chica</i> - Fonte de pigmento	26
I.2.4. <i>Arrabidaea chica</i> – Uso popular e atividade biológica	27
I.2.5. <i>Arrabidaea chica</i> – Composição química	31
I.2.5.1. Antocianinas e antocianidinas	31
I.2.5.2. Desoxiantocianidinas	32
I.2.5.3. <i>Arrabidaea chica</i> – substâncias isoladas	33
I.2.6. <i>Arrabidaea chica</i> – Estabilidade de substâncias e extratos	36
I.2.7. Métodos quimiométricos	39
I.2.7.1. Análise de Componentes Principais (PCA)	40
I.2.7.2. Análise de Componentes Principais Multi-modo – MPCA	40
I.2.7.3. PURE	41
I.2.7.4. Resolução Multivariada de Curvas (MCR)	41
I.2.7.5. Análise Discriminante com Calibração Multivariada PLS-DA	42
I.3. ARRABIDAEA CHICA – MÉTODOS ANALÍTICOS	44
I.3.1. HPLC-DAD	44
I.3.2. LC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry)	44
I.3.3. ESI-MS/MS (Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry)	45
I.3.4. Fingerprinting – Caracterização por ESI-MS	45
I.3.5. Fluorescência de Raios-X	46
I.4. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	48
I.5. OBJETIVO	50
I.5.1. Objetivo geral	50
I.5.2. Objetivos Específicos	50
CAPÍTULO II: OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA FOLHAS DE <i>A. CHICA</i> COM ELEVADOS TEORES DE DESOXIANTOCIANIDINAS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS E DE PURIFICAÇÃO	51

II.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO RICO EM 3-DESOXIANTOCIANIDINAS (3DAE) E SUBSTÂNCIA S-3 A PARTIR DAS FOLHAS DA <i>A. CHICA</i>	52
II.1.1. Material e Métodos	52
II.1.1.1. Planta	52
II.1.1.2. Solventes utilizados nas extrações	52
II.1.1.3. Obtenção de extrato rico em 3-desoxiantocianidinas das folhas da <i>A. chica</i>	53
II.1.1.4. Caracterização do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas, 3DAE	56
II.1.1.4.1. Análise utilizando cromatografia de camada delgada (CCD)	56
II.1.1.4.2. Análise utilizando-se HPLC-DAD	56
II.1.1.4.3. Análise por ESI-MS e ESI-MS/MS	57
II.1.1.4.4. Análise utilizando-se HPLC-MS/MS	57
II.1.1.5. Obtenção da S-3 , íon 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílico	57
II.1.1.6. Análise de S-3 utilizando-se HPLC-DAD, ESI-MS e ESI-MS/MS	60
II.1.2. Resultados e Discussão	60
II.1.2.1. Caracterização do extrato 3DAE utilizando HPLC-DAD	60
II.1.2.2. Caracterização do extrato 3DAE utilizando HPLC-MS/MS	61
II.1.2.3. Caracterização e perfis das 3-desoxiantocianidinas utilizando ESI-MS e ESI-MS/MS	61
II.1.2.4. Caracterização da S-3 por HPLC-DAD, ESI-MS e ESI-MS/MS	65
II.2. CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS E FOLHAS DE 3 VARIEDADES DE <i>A. CHICA</i> UTILIZANDO TÉCNICAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	67
II.2.1. Caracterização por ESI-MS – “Fingerprinting”	67
II.2.1.1. Material e Métodos	67
II.2.1.1.1. Planta e preparação de amostras	67
II.2.1.1.2. Solventes utilizados	69
II.2.1.1.3. Obtenção dos extratos para caracterização por <i>fingerprinting</i>	69
II.2.1.2. Resultados e discussão da caracterização por <i>fingerprinting</i>	70
II.2.2. Caracterização por Fluorescência de Raios-X (FRX)	78
II.2.2.1. Material e Métodos	79
II.2.2.1.1. Planta e preparação de amostras	79
II.2.2.1.2. Caracterização das amostras por fluorescência de raios-X	80
II.2.2.2. Resultados e discussão da caracterização por fluorescência de raios-X	81
II.3. EXTRAÇÃO UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO	89
II.3.1. Material e Métodos	89
II.3.1.1. Planta e preparação das amostras	89
II.3.1.2. Solventes utilizados	90
II.3.1.3. Extração com CO ₂ supercrítico saturado com etanol	90

II.3.2. Resultados e discussão.....	92
II.4. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	94
CAPÍTULO III: ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA <i>A. CHICA</i>.....	95
III.1. MATERIAL E MÉTODOS	96
III.1.1. Planta	96
III.1.2. Solventes e reagentes utilizados.....	96
III.1.3. Preparação de extratos e frações	96
III.1.4. Caracterização de extratos por LC-MS e LC-MS/MS	98
III.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	100
III.2.1. Preparação das amostras para os testes de atividade antimicrobiana	100
III.2.3. Cepas Microbianas.....	100
III.2.4. MIC e MFC	100
III.2.5. Resultados e Discussão	101
III.2.5.1. Atividade antifúngica	101
III.2.5.2. XIC LC-MS: perfil dos extratos ativos	105
III.2.6. Conclusão	107
III.3. OUTRAS ATIVIDADES DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA <i>A. CHICA</i>.....	108
III.3.1. Atividade anti-inflamatória e cicatrizante	108
III.3.1.1. Amostras testadas.....	108
III.3.1.2. Descrição dos testes	108
III.3.1.3. Resultados e conclusão.....	108
III.3.2. Citotoxicidade.....	109
III.3.2.1. Amostras testadas.....	109
III.3.2.2. Descrição dos testes	109
III.3.2.3. Resultados e Discussão	109
III.3.2.4. Conclusão.....	110
III.4. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	111
CAPÍTULO IV: INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO UV E DO PH NO COMPORTAMENTO CINÉTICO EM EXTRATOS DAS FOLHAS DA <i>A. CHICA</i> CONTENDO DESOXIANTOCIANINAS.....	112
IV.1. MATERIAL E MÉTODOS	113
IV.1.1. Planta.....	113
IV.1.2. Solventes e reagentes utilizados	113
IV.1.3. Equipamentos utilizados	113

IV.1.4. Obtenção dos extratos	113
IV.1.5. Soluções Tampão	114
IV.1.6. Medidas espectrais na região de UV-vis.....	115
IV.1.7. Avaliação do tempo de meia vida através da cinética de reação.....	117
IV.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
IV.2.1. Medidas espectrais na região de UV-vis.....	119
IV.2.1.1. Substância S-3 , carajurina	119
IV.2.1.2. Extrato etanólico, EtOH-dry.....	125
IV.2.2. Avaliação do tempo de meia vida através da cinética de reação.....	129
IV.2.2.1. Extrato S-3	129
IV.2.2.2. Extrato etanólico, EtOH-dry.....	132
IV.2.2.3. Extrato diclorometano (DCM)	134
IV.2.2.4. Extrato concentrado nas desoxiantocianidinas, 3DAE	137
IV.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	141
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES GERAIS.....	142
CAPÍTULO VI: REFERÊNCIAS.....	145

Capítulo I: Introdução, Métodos e Objetivos

I.1. Motivação do Trabalho

Plantas medicinais têm atraído atenção por seu potencial uso nas áreas da medicina, fitoterapia e cosmética em todo o mundo. *Arrabidaea chica* é uma planta muito utilizada popularmente, especialmente na região amazônica pelas suas propriedades tintoriais, medicinais e cosméticas. Apesar de ser utilizada atualmente em algumas formulações comerciais, para entender seu uso como medicamento ou fitoterápico, há necessidade de conduzir estudos conforme padrões modernos recomendados por órgãos de saúde, como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (*Food and Drug Administration* dos Estados Unidos).

Este trabalho inclui contribuições para o desenvolvimento de extratos padronizados de *A. chica*. Os resultados permitem potencial utilização em aplicações nas áreas de fitomedicina e cosméticos.

Após um levantamento bibliográfico que inclui composição química, atividade biológica e estabilidade como principais pontos, serão apresentados objetivos, métodos utilizados e, em seguida, serão discutidos os principais resultados obtidos e as considerações finais. Optou-se pela divisão da tese em capítulos para maior organização.

I.2. Levantamento Bibliográfico

I.2.1. A importância das plantas medicinais como fontes de novos medicamentos

Historicamente, os produtos naturais de origem vegetal são de fundamental importância para a descoberta de novos medicamentos. De modo geral, as plantas popularmente conhecidas são as que têm sido mais exploradas em estudos científicos. Em uma primeira etapa é realizado a produção de extratos, que algumas vezes levam ao isolamento de substâncias ativas, que podem ser inéditas ou não, e em seguida é feita a elucidação da estrutura molecular destas substâncias. A partir deste ponto muitas etapas são transcorridas até se chegar ao fitomedicamento, também chamado de fitofármaco, como a caracterização e padronização dos extratos que contêm o princípio ativo, desenvolvimento da cadeia produtiva até o ativo padronizado, testes de eficácia, entre outros (**Figura 1**) (SHENKEL et al., 2000). A síntese destes compostos (compostos idênticos aos naturais) pode ser realizada posteriormente caso seja de interesse econômico.

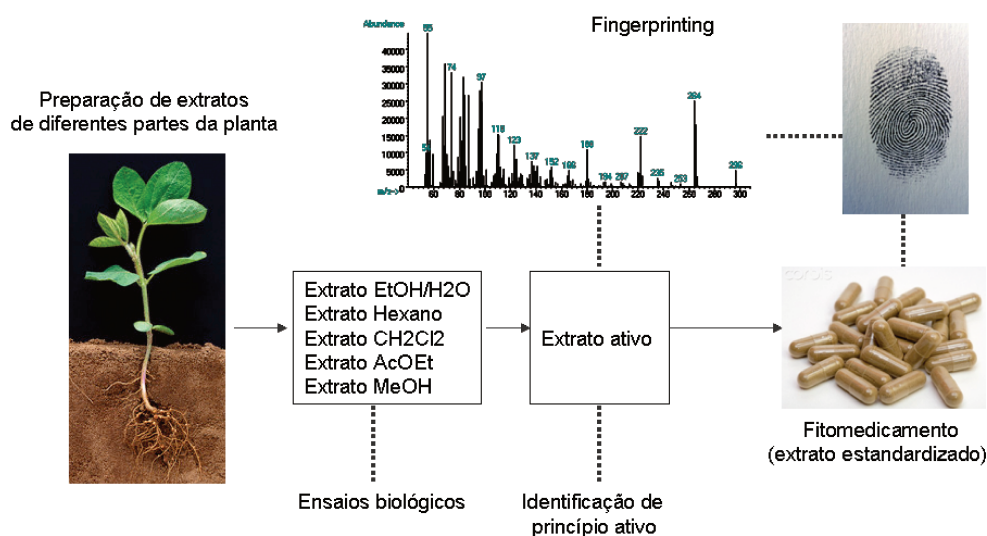


Figura 1. Esquema da obtenção de fitomedicamento/fitofármaco a partir de partes de uma planta.

É importante esclarecer a diferença entre fitoterápico e fitofármaco. Segundo a ANVISA (2015) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e Ferreira et

al. (1998) medicamentos fitoterápicos são aqueles originados de material botânico integral de plantas medicinais ou de seus extratos e são usados com o propósito de tratamento médico. Eles podem ser industrializados ou manipulados, sendo que os industrializados são produzidos por indústrias farmacêuticas e devem ser registrados na ANVISA antes de sua comercialização. Os manipulados são produzidos em farmácias de manipulação. Por definição, fitofármaco é o medicamento que utiliza a substância ativa isolada, purificada ou semi-sintetizada a partir de matéria prima vegetal. Os medicamentos em geral ainda fazem amplo uso de compostos naturais ou idênticos aos naturais em contraposição aos compostos sintéticos, eles estão presentes na composição de medicamentos anticâncer (60 %) e doenças infecciosas (75 %) (NEWMAN et al., 2003; NEWMAN E CRAGG, 2012). Com relação aos fitoterápicos, segundo projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM, 2017), o mercado movimenta de 400 a 500 milhões de dólares por ano no Brasil. No mundo, estima-se que o gasto com plantas medicinais chegue à cifra de US\$ 27 bilhões (em torno de 7 % do mercado mundial de medicamentos). Entretanto, enquanto o mercado farmacêutico cresce de 3 % a 4 % ao ano no mundo, o fitoterápico sobe de 6 % a 7 %.

Uma informação importante é que próximo de dois terços ou três quartos da população mundial prefere o uso de produtos farmacêuticos baseados em plantas medicinais (WHO, 2003). Entende-se por plantas medicinais aqui, substâncias ou preparações a partir de produtos medicinais que têm potencial utilização como agente farmacêutico. As plantas mostram-se as mais promissoras fontes de substâncias ativas devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos e, talvez, seja a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (BRANDÃO et al., 2010). Apesar disso, estima-se que somente 10% das espécies de plantas floríferas do planeta foram estudadas com relação ao potencial farmacêutico; se olharmos para as florestas tropicais, esse número cai para 1% (GURIB-FAKIN, 2006).

Algumas das maiores oportunidades do uso de produtos de origem vegetal encontram-se na área farmacêutica, agroquímica, cosmética, química fina e nutracêutica. O desenvolvimento de drogas para a indústria farmacêutica, no entanto, pode levar até cerca de 20 anos para chegar ao mercado e ser comercializada ou, mais recentemente, em torno de 10 anos com um grande investimento financeiro estimado entre US\$ 0,5 a 1,2 bilhão. Cabe destacar que os

riscos são grandes, pois sempre existe a chance do fármaco falhar em uma das etapas do processo de desenvolvimento. Segundo JAMES (2010), a cada ano somente cerca de 20 novos fármacos são aprovados para comercialização, dos quais 75% são aqueles chamados de “me too”, isto é, fármaco estruturalmente similar a um já presente no mercado. Com o aparecimento mais recente de novas tecnologias como a *high throughput screening*, a química combinatória, robótica, entre outros, a indústria farmacêutica tem se distanciado cada vez mais de produtos naturais como fontes de drogas potenciais (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Existem milhões de tipos de estruturas químicas naturais disponíveis na natureza resultantes da química combinatória que resulta numa diversidade química de estruturas complexas que interagem com moléculas biológicas. A natureza, sozinha, vem fazendo essa seleção há séculos e vem selecionando produtos desta biblioteca combinatorial que tem vantagens biológicas específicas. Conforme descrito por Aristóteles: “*Nature does nothing without purpose or uselessly*” (MCCHESNEY et al., 2007).

A região amazônica é conhecida por ter uma imensa e inexplorada biodiversidade proveniente do conhecimento de índios que têm utilizado plantas medicinais para o tratamento de doenças há séculos (ELISABETSKY e SHANLEY, 1994). Algumas destas plantas já foram estudadas cientificamente, outras foram pouco exploradas até o momento e muitos conhecimentos já se perderam (GRANZ, 2007). Neste trabalho foi selecionada uma planta secular da região Amazônica cientificamente denominada *Arrabidaea chica*.

1.2.2. *Arrabidaea chica* - Informação botânica

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot, syn. *Bignonia chica* pertence ao reino Plantae, à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Lamiales e família Bignoniaceae. A família Bignoniaceae consiste de 120 gêneros e 800 espécies (VON POSER et al., 2000), é largamente encontrada nas regiões tropicais da América Central e Sul, assim como na África. Em estudos sistemáticos (GENTRY, 1980) a Bignoniaceae foi dividida em 8 tribos, das quais 3 são encontradas no Brasil, tanto no cerrado, na mata Atlântica como na região Amazônica. São predominantemente lianas e tem como exemplos mais representativos o Jacarandá, Ipês amarelo e roxo (*Jacarandá brasiliana*, *Tabebuia*

alba, *T. avellaneda* e outras *Tabebuia* spp.). Além de utilização na construção civil são também usados como plantas ornamentais, devido à beleza de suas florações (LORENZI e MATOS, 2002). Embora a família seja relativamente grande, apenas um pequeno número de espécies foi estudado quimicamente. O gênero *Arrabidaea* é encontrado desde o sul do México até o sul do Brasil.

A. chica é conhecida popularmente como crajiru (estado do Amazonas), pariri (estado do Pará), carajiru, punca-panga, chica, cipó-pau, cipó-cruz, dentre outros (BARROSO, 1991; MORS, 2000). É caracterizada morfológicamente como uma planta arbustiva ascendente, podendo atingir 2 m de altura. Possui folhas compostas, bi- ou trifolioladas, de folíolos oblongo-lanceoladas, de 8-13 cm de comprimento (**Figura 2**). As flores campanuladas de cor róseo-lilacina são dispostas em panículas terminais. Os frutos são silíquas deiscentes (MCCHESENEY et al., 2007), sendo comum a presença de folhas modificadas denominadas gavinhas (órgão de suporte), que auxiliam na fixação a um substrato.



Figura 2. *Arrabidaea chica* da foto é conhecida como tipo/variedade I. Foto obtida em Campinas, SP.

A planta é facilmente cultivável e tem ciclo de crescimento rápido (BARROS et al., 2008), no entanto, é muito difícil de florescer. No estado do Amazonas predomina uma variedade de *A. chica*, conhecida como tipo I ou variedade I, tem folhas mais finas e uma tendência a crescer na vertical, enquanto que as outras variedades têm folhas mais largas e uma tendência a se espalhar

horizontalmente. As folhas dos tipos I, II e III são cultivadas na Embrapa Ocidental da Amazônia, Manaus, AM (VON POSER, 2000).

De acordo com Carvalho et. al. (2006), a variedade mais comum ornamentalmente falando é a variedade I, que tem folhas finas e é mais ereta se comparado com as outras, que apresentam folhas mais largas e maior tendência a serem escandentes. Uma característica comum a todos os tipos e que dificulta a sua identificação taxonômica é a ausência de flores nas condições da Amazônia, relatos mencionam apenas material estéril. Carvalho et. al. (2006) determinaram o número de cromossomos das três variedades cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental, buscando contribuir para a caracterização dos acessos. Para as variedades I e II, foram contados pelo menos 38 cromossomos por núcleo. Para a variedade III, foram contados 48 e até mais de 50 cromossomos por núcleo. As variedades II e III apresentam maior similaridade entre si morfológicamente do que quando comparados com a variedade I, e considerou-se possível que a variedade III pudesse ser um poliplóide originado de plantas da variedade II, com a diferença que alguns dos órgãos na variedade III, como folhas e gavinhas, mostram-se maiores e mais robustos. No entanto, as contagens de cromossomos não foram consideradas conclusivas até o momento, embora tenham servido para averiguar que a variedade III tenha aparentemente um número maior de cromossomos não foram suficientes para demonstrar a relação entre as variedades.

As folhas frescas têm coloração verde, mas após a secagem, tornam-se vermelho-amarronzadas. A tonalidade vermelha pode ser acentuada se a secagem for feita na presença de luz solar, e existem evidências que a cor que a planta adquire seja devido ao processo de oxidação natural de componentes presentes na planta.

1.2.3. *Arrabidaea chica* - Fonte de pigmento

As folhas frescas na forma de decocto são empregadas há séculos pela população indígena para tatuagens e pinturas no corpo. Primeiros relatos datam da região dos rios Orinoco e Meta (Colômbia e Venezuela). O pigmento é chamado de *chica red*, carajura ou crajura (CHAPMAN et al., 1927).

A planta tem considerável potencial tintorial, o que pode ser explorado, tanto para uso em cosméticos como em alimentos. Melo (2007) explorou o potencial do corante extraído das folhas de *A. chica* comparativamente com o corante extraído da flor do Cacauí (*Theobroma speciosum*) no tingimento do couro de peixe para utilização em artesanato e outros. O corante extraído da *A. chica* apresentou boa resistência à luz e um bom poder de coloração.

Os pigmentos naturais aprovados para uso em alimentos são limitados, e requerem uma rigorosa aprovação do JECFA (comitê de experts em aditivos alimentícios administrado pela FAO e WHO, do inglês - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Onde FAO é a organização de alimentos e agricultura das Nações Unidas, do inglês - Food and Agriculture Organization of the United Nations e WHO é a organização mundial da saúde, do inglês - World Health Organization. Suas responsabilidades incluem a avaliação de contaminantes, toxinas naturais e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Uma melhor compreensão e aprovação das fontes de pigmentos contribuem para o aumento do seu uso. Com o objetivo de atender a constante demanda por novas cores surgem constantes pesquisas em torno da estabilidade destes pigmentos naturais (WISSGOT e BORTLIK, 1996; CLYDESDALE, 1993; SCHIOZER et al., 2008).

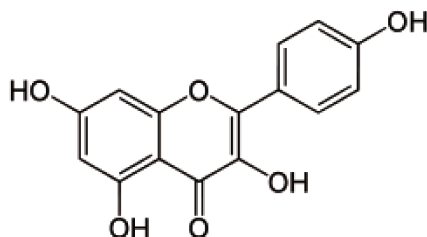
No capítulo IV desta tese é explorado o estudo de estabilidade de extratos ricos em desoxiantocianinas, substâncias raras encontradas em *A. chica*.

1.2.4. *Arrabidaea chica* – Uso popular e atividade biológica

A. chica é utilizada na medicina tradicional para limpeza de feridas crônicas e para o tratamento de doenças de pele como micoses e herpes (BARBOSA et al., 2004). Devido seu uso tradicional, já há alguns anos é explorada por pequenas indústrias cosméticas na Amazônia (Empresas Pharmakos (<http://www.pharmakos.com.br/>), Anauá (<https://pt-br.facebook.com/Anau%C3%A1-Essencias-DA-Amazônia-263332643741113/>), Pronatus (<http://pronatus.com.br/loja/>), entre outras. Suas folhas são utilizadas como infusões e consumidas como bebida quente ou gelada. É muito apreciada pela sua cor vermelha e por ser levemente doce. Tem função adstringente, promove a cicatrização da pele e é usada em banhos de assento, no tratamento de diarreias sanguinolentas, anemia, leucemia, icterícia, albuminúria, psoríase e enterocolite

(CORREA, 1984; MORS, 2000; LORENZI e MATOS, 2002; MCCHESENEY et al., 2007; MELO et al., 2007).

Na medicina tradicional, o uso continuado de chás e compressas é conhecido por proporcionar aos pacientes um risco reduzido de contração de infecções através de organismos resistentes (SANTOS et al., 1995; ZAIAS e GERBERT-REBELL, 1996; ROJAS et al., 2006; VILA et al., 2010). Ingredientes e extratos ativos foram relatados em vários artigos como potenciais substitutos para fármacos onde a resistência a drogas é importante (NASCIMENTO et al., 1990; ARTIZZU et al., 1995; IZZO et al., 1995; ELLOF, 1998; ALIGIANNIS et al., 2001; RIOS e RECIO, 2005). Adicionalmente, o Ministério de Saúde do Brasil expandiu o número de plantas medicinais de interesse pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Dentre as 70 plantas aprovadas encontra-se a *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. Para a comercialização destas plantas, será necessário a padronização de extratos desta e de outras plantas ainda pouco estudadas (RENISUS, <http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com/plantas-medicinais-do-sus/>) Gemelli et al. (2015) pesquisaram o uso seguro da *A. chica*, estudando os efeitos mutagênicos e genotóxicos do extrato bruto aquoso em cultura de células de camundongos. Os extratos aquoso e butanólico não apresentaram atividade mutagênica frente a sepas de *Salmonella typhimurium* e mostraram respostas negativas para genotoxicidade. Os autores atribuíram os resultados à composição fitoquímica da planta e à alta concentração de compostos anti-inflamatórios. Mafioleti et al. (2013) confirmaram a não toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas da *A. chica*, segundo eles, a análise fitoquímica do extrato revelou a presença de compostos fenólicos e a análise por *fingerprint* utilizando espectrometria de massas revela a presença de 3-desoxiantocianidinas (**item I.2.5.2**) e kaempferol.



Kaempferol

Tafarello (2008) e Tafarello et al. (2013) sugeriram que a ação cicatrizante dos extratos brutos da *A. chica* pode estar relacionada à presença das antocianinas, uma vez que os extratos ricos em antocianidinas (agliconas) não estimularam o crescimento celular, e ainda, demonstraram que a atividade cicatrizante do extrato bruto da *A. chica* é inversamente proporcional ao aumento da concentração de uma das 3-desoxiantocianidinas presente na planta, como relata artigo.

Encontrou também que as atividades anticâncer e antioxidante estão diretamente relacionadas com o aumento do teor de agliconas livres no extrato bruto da *A. chica*. Outros resultados de atividade antioxidante e cicatrização foram relatados por Pauly et al. (2001) e Jorge et al. (2008). Jorge (2013) obteve resultados significantes para cicatrização de úlceras cutâneas e da mucosa gástrica utilizando extrato etanólico encapsulado.

Oliveira et al. (2009) estudou a atividade anti-inflamatória de extratos aquosos da *A. chica* frente a edemas induzidos de veneno de serpente em camundongos. Ao aplicar o extrato via subcutânea, a inflamação foi reduzida. Os dados experimentais sugerem que o extrato aquoso apresenta substâncias químicas com atividade inibitória do processo inflamatório. Michel et al. (2015) recentemente confirmaram a atividade anti-inflamatória de extratos aquoso e etanólico.

Nos últimos anos têm aumentado substancialmente infecções por fungos e parte deste problema é pelo fato dos tratamentos não serem eficazes. Uso abusivo ou mau uso de drogas antifúngicas podem gerar resistência a drogas, além do fato de algumas delas serem tóxicas (SOUZA et al., 2002; SOUZA et al., 2003; FENNER et al., 2006). Dentre os dermatófitos, o gênero *Trichophyton* é o mais encontrado em infecções de pele (CHUANG et al., 2007). Alguns estudos mostram atividade de extratos de plantas frente a fungos. Bajpai et al. (2009) estudaram a atividade de extratos de *Metasequoia glyptostroboides* frente a cepas de *Trichophyton* e encontraram valores de MIC (Concentração Inibitória Mínima) variando de 62,5 a 4000 µg / mL. Similarmente Duraipandiyan e Ignacimuthu (2009) estudaram o extrato da *Toddalia asiatica* frente a cepas de *Trichophyton* e encontraram valores de MIC variando entre 62,5 a valores superiores a 1000 µg / mL.

Barata et al. (2006) (um dos trabalhos resultantes desta tese (Capítulo III) encontraram frações extraídas das folhas da *A. chica* apresentando atividade antimicrobiana utilizando normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), métodos de referência para diluição em caldo de leveduras e fungos filamentosos.

As frações mais ativas apresentaram $MIC \leq 100 \mu g / mL$ e MFC (Concentração Fúngica Mínima) $\leq 1500 \mu g / mL$ para as leveduras *Candida albicans*, *parapsilosis* e *krusei*. Para dermatófitos apresentaram valores de MIC e MFC $\leq 100 \mu g / mL$ frente a cepas de *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* e apresentaram halos maiores que 12 mm para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *S. hominis*.

Barbosa et al. (2008) investigaram a atividade de extratos de *A. chica* contra leveduras e dermatófitos também usando método de microdiluição em caldo, no entanto, os extratos testados exibiram baixa atividade, $MIC = 3,125 mg / mL$, frente a cepas de *T. mentagrophytes*.

Ribeiro (2008) encontrou para o extrato etanólico bruto das folhas de *A. chica* atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (MIC de $62,5 \mu g / mL$), contra *Escherichia coli* (MIC de $250 \mu g / mL$) e contra *Candida albicans* (MIC de $500 \mu g / mL$). Cartágenes (2009) demonstrou que a administração crônica de extrato hidro-alcoólico das folhas de *A. chica* em ratos hipertensos induziu um efeito hipotensor com ausência de efeitos toxicológicos, e concluiu que o efeito hipotensor deve estar relacionado com a inibição da disponibilidade de cálcio intracelular.

Segundo os critérios de Holetz et al. (2002), um valor de MIC abaixo de $100 \mu g / mL$ é considerado boa atividade antimicrobiana, de 100 a $500 \mu g / mL$ é considerada uma moderada atividade, de 500 a $1000 \mu g / mL$ é considerada atividade fraca e maior que $1000 \mu g / mL$ é considerada inativa. Com base nesta classificação, resolveu-se aprofundar os estudos de atividade antimicrobiana previamente apresentados pela autora e colaboradores (BARATA et al., 2006). Os resultados estão apresentados no Capítulo III desta tese.

Vários produtos cosméticos contendo extratos de *A. chica* foram registrados na ANVISA, e têm sido comercializados por pequenas indústrias cosméticas na Amazônia, explorando os potenciais antimicrobianos, adstringentes, entre outros (ANVISA – Crajiru, 2015).

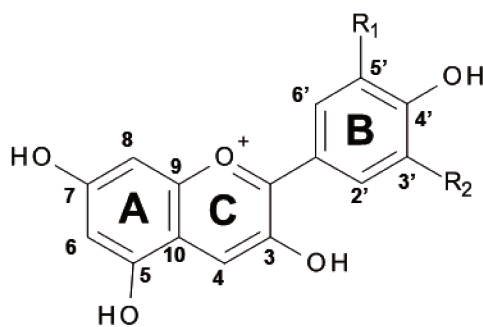
O Capítulo III desta tese discute resultados biológicos obtidos com extratos de *A. chica* e mostra resultados inéditos e de grande valor para atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e citotóxica.

I.2.5. *Arrabidaea chica* – Composição química

Alves et al. (2010) em *screening* fitoquímico das folhas da *A. chica* indicou a presença de classes químicas tais como: açúcar redutor, alcaloides, antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, esteroides, triterpenoides, fenóis, flavanonóis, flavanóis, flavanonas, saponinas e taninos catéquicos. Nosso estudo explora principalmente as antocianidinas.

I.2.5.1. Antocianinas e antocianidinas

As antocianinas são substâncias muito importantes dentre os flavonóides devido ao seu poder corante e também pelos benefícios para saúde, dentre eles a sua capacidade antioxidante. Antocianinas são comumente encontradas na natureza na sua forma glicosilada. Após perda de açúcar por hidrólise ácida, as agliconas são denominadas de antocianidinas. As antocianidinas mais comumente encontradas na natureza são as cianidinas, peonidinas, pelargonidinas, delfinidinas, petunidinas e malvidinas (**Figura 3**). A diferença entre as várias antocianidinas está no número de grupos hidroxílicos em suas estruturas, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares que compõem suas estruturas e na posição onde esses açúcares se ligam no núcleo flavonoídico, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao(s) açúcar(es) da antocianina. Raramente as antocianinas são passíveis de serem isoladas devido a sua instabilidade (GIUSTI e WROLSTAD, 2003). Com a mesma origem dos demais flavonóides naturais, as antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6, no entanto, possuem a particularidade de absorverem fortemente na região visível do espectro eletromagnético (COHEN et al., 2002).



Aglicona	R ₁	R ₂	λ_{max} (nm)
Pelargonidina	H	H	494
Cianidina	OH	H	506
Peonidina	OMe	H	506
Delfinidina	OH	OH	508
Petunidina	OMe	OH	508
Malvinidina	OMe	OMe	510

Figura 3. Antocianidinas comumente encontradas na natureza e comprimento máximo de absorção no UV-VIS.

I.2.5.2. Desoxiantocianidinas

O pigmento vermelho presente nas folhas da *A. chica* é creditado a um grupo de 3-desoxiantocianidinas. Ao contrário das antocianinas, que são largamente encontradas na natureza, as 3-desoxiantocianidinas, embora mais estáveis, são raras e encontradas apenas em algumas espécies de plantas. O que diferencia as 3-desoxiantociandinas das antocianidinas é a ausência do grupo hidroxila na posição C3 dos seus esqueletos. As desoxiantocianinas são encontradas na natureza principalmente como agliconas, chamadas de desoxiantocianidinas. Elas são consideradas as substâncias ancestrais das antocianinas, já que são encontradas

em samambaias e musgos, as quais são consideradas as mais primitivas das plantas na terra (MELO et al., 2009).

Sua presença foi detectada nas flores de Gesneriaceae (HARBORNE, 1966; HARBORNE, 1967). As substâncias mais comuns desta classe são as luteolinidinas e apigeninidinas (**Figura 4**), encontradas mais comumente em plantas inferiores e em plantas superiores como espécies de sorgo (*Sorgum species*) (STAFFORD, 1965; REY et al., 1993; IWASHINA, 2000), *Zea mays* (HALBWIRTH et al., 2003), black tea (HARBORNE, 1999), e samambaias (HARBORNE, 1967), incluindo a espécie *Azolla* spp. (COHEN et al., 2002; COHEN et al., 2002) e flores de Gesneriaceae, (CHUANG et al., 2007; BAJPAI et al., 2009) dentre outras.

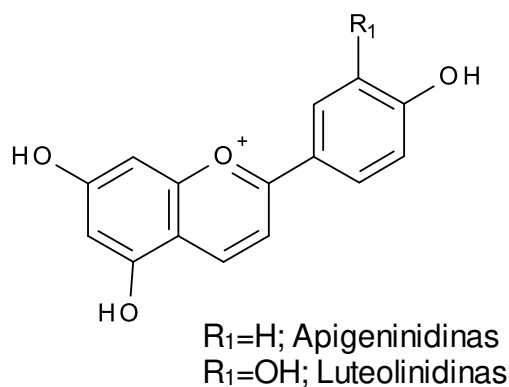


Figura 4. 3-Desoxiantocianidinas encontradas em plantas inferiores.

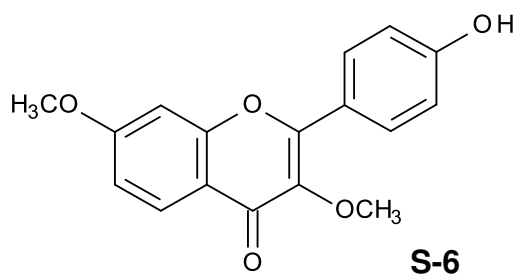
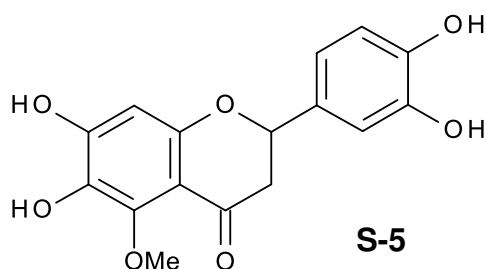
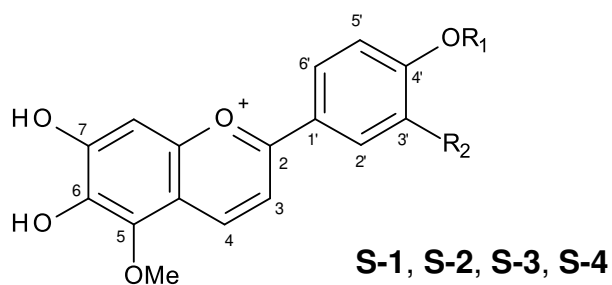
Nas espécies de sorgo, as 3-desoxiantocianinas (NICHOLSON et al., 2001) possuem um papel importante como fitoalexinas. Fitoalexina é um termo usado para compostos que atuam como antibióticos de plantas que são sintetizados depois que o tecido da planta é exposto a uma infecção microbiana (VANETTEN et al., 1994).

1.2.5.3. *Arrabidaea chica* – substâncias isoladas

Chapman et al. (1927) estudaram a estrutura do principal constituinte da *A. chica* e chamaram-na de carajurina ou 6,7-diidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio, (**S-3**) (**Figura 5**). Chapman et al. (1927), Scogin (1980) e Harborne e Baxter (1999) propuseram que a ocorrência deste pigmento raro em Bignoniaceae seria

provavelmente restrita à espécie *Arrabidaea chica*. Takemura (1993) identificou a presença de antocianinas, flavonóides, taninos e fitosteróis nas partes aéreas desta planta. Zorn et al. (2001) isolaram três novas 3-desoxiantocianidinas, a 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavílio, (**S-1**), a 6,7,4'-triidroxi-5-metoxiflavílio, (**S-2**), e a 6,7,3'-triidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio, (**S-4**). Devia et al. (2002) também isolaram duas das substâncias acima e confirmaram a estrutura de **S-3**, além de demonstrar que a técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) é efetiva para a determinação de 3-desoxiantocianidinas em extratos de *A. chica*. Os últimos dois artigos suportam a hipótese de Harborne (1967) de que 6-hidroxilação é uma estrutura típica de flavonóides presentes nas Bignoniaceae. Takemura et al. (1995) e Barbosa et al. (2008) isolaram e determinaram estruturas de duas novas flavonas a partir das folhas da *A. chica*, a 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavona, **S-5**, e a 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona, **S-6**, respectivamente.

No Capítulo II desta tese são discutidos métodos de obtenção de extratos ricos e purificados nas desoxiantocianinas contidas nas folhas da *A. chica*. Os métodos são inéditos e mais diretos do que relatados anteriormente em literatura.



Substância	R ₁	R ₂	ESI-MS m/z	Fragmentos m/z	Identificação	Referências
S-1	H	OH	301	286	6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavílio	Devia et al., 2002; Zorn et al., 2001
S-2	H	H	285	270	Carajurona , 6,7,4'-triidroxi-5-metoxiflavílio	Devia et al., 2002; Zorn et al., 2001
S-3	CH ₃	H	299	284, 269	Carajurina , 6,7-diidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio	Chapman et al., 1927; Devia et al., 2002; Zorn et al., 2001
S-4	CH ₃	OH	315	300	6,7,3'-triidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio	Zorn et al., 2001
S-5			316	301, 298, 273, 270	Carajuflavona , 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavona	Takemura et al., 1995
S-6			298	283, 255, 145	4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona	Barbosa et al., 2008

Figura 5. 3-Desoxiantocianidinas e flavonas isoladas da *A. chica*.

1.2.6. *Arrabidaea chica* – Estabilidade de substâncias e extratos

Alguns pigmentos naturais são mais estáveis *in vivo* que na forma isolada. As plantas parecem desenvolver estratégias para proteger suas cores já que são expostas à luz, calor e oxidação química (WISSGOT e BORTLIK, 1996).

As antocianinas são compostos que podem sofrer reações que podem alterar facilmente sua estrutura devido a deficiência eletrônica do seu núcleo flavílio. A estabilidade das antocianinas aumenta com o número de grupos metoxila no anel B e diminui com o aumento das hidroxilas (**Figura 3**). Em geral, as antocianinas são mais estáveis em condições ácidas, após glicosilação ou acetilação de seus açúcares (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004). São usadas em produtos comerciais, mas devido a sua variação de cor com a mudança de pH e restrições com estabilidade, existe preferência para seu uso em meio ácido.

A natureza iônica das antocianinas favorece a mudança da estrutura molecular com a variação do pH, resultando em diferentes cores para diferentes valores de pH (BROUILLARD, 1982; BROUILLARD et al., 1982; TERCÍ e ROSSI, 2002). Para entender melhor a variação da estabilidade das antocianinas, tem-se que em soluções aquosas elas apresentam diferentes estruturas em função do pH (MELO et al., 2002). Em meio ácido as antocianinas são avermelhadas, o que corresponde à estrutura do cátion flavílio. Nas proximidades de pH 6, as antocianinas perdem a cor devido à predominância da pseudobase carbinol. Com o aumento gradativo do pH observa-se a formação de estruturas de cor violeta, as anidrobases quinoidais. Em valores de pH acima de 8 começa a ocorrer a ionização das antocianinas e entre pH 9 e 12 aparecem as estruturas de anidrobases de coloração azul. Para valores de pH acima de 9 pode ocorrer a ruptura do anel heterocíclico com a formação de estruturas conhecidas como chalconas. Após a abertura do anel, as mudanças são irreversíveis. A **Figura 6** apresenta as possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.

Essa mudança estrutural que ocorre com as antocianinas também acontece com as desoxiantocianinas. A diferença na sua estrutura favorece uma maior estabilidade, embora essa maior estabilidade não seja muito discutida na literatura. As desoxiantocianinas são encontradas na natureza na sua maioria como agliconas, as desoxiantocianidinas. As antocianidinas, desoxiantocianidinas e sais de flavílio são substâncias que têm um centro estrutural comum: 2-fenil-benzo-pirílio,

e são envolvidas num mesmo conjunto de reações químicas seguindo um mesmo padrão (MELO et al., 2002).

Muitos estudos de antocianinas usam o método da mudança do pH para calcular as constantes de equilíbrio (BROUILLARD, 1882). No entanto é difícil calcular o número de espécies que contribuem para o espectro. Nos experimentos utilizados neste trabalho utilizaram-se métodos quimiométricos para estimar o número de espécies num sistema composto de mais de uma substância.

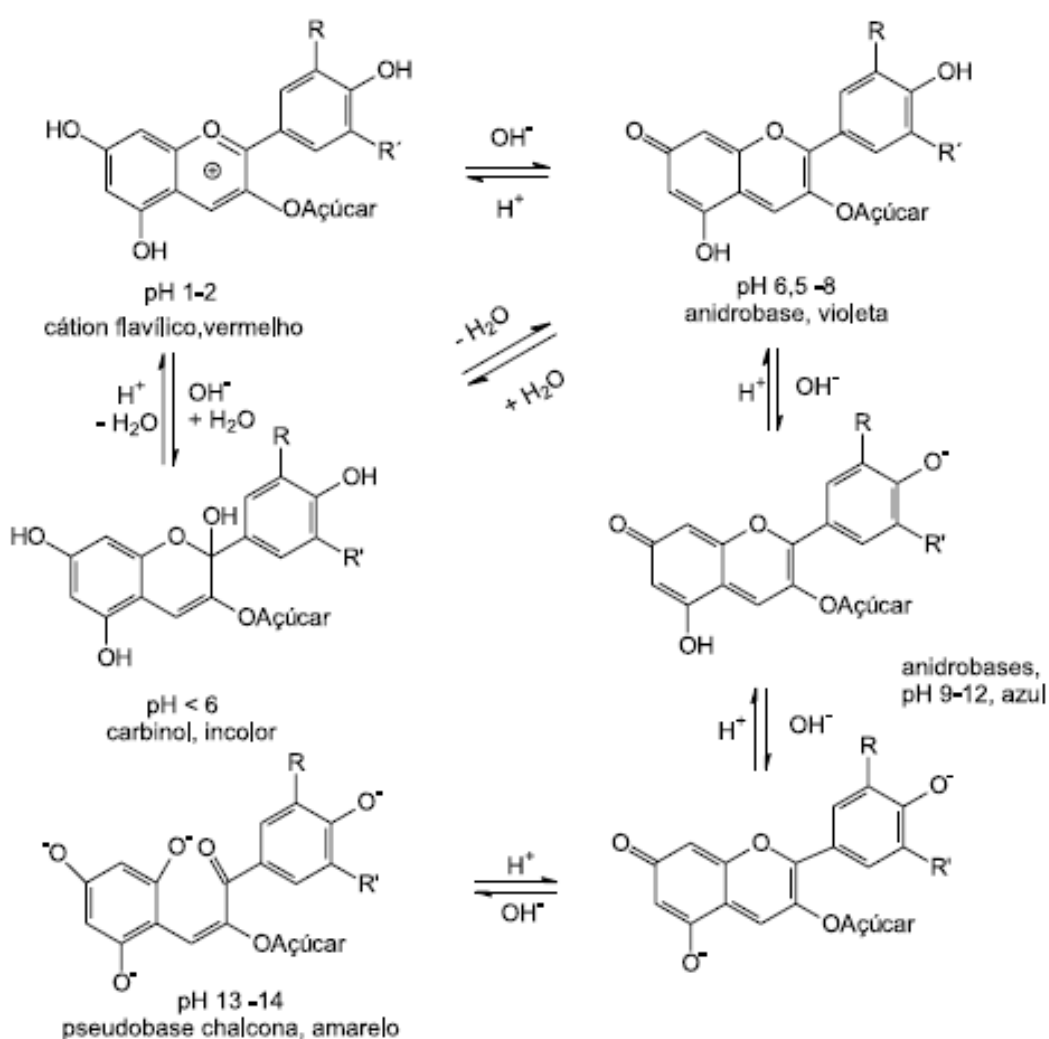


Figura 6. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.

Um modelo quimiométrico foi identificado baseado na análise numérica e estatística de dados para solucionar o problema de análises de misturas sem uma prévia suposição a respeito da natureza ou da composição do sistema sob investigação. A análise de misturas investiga o número de espécies químicas simultaneamente presentes numa mistura, assim como a determinação da sua concentração na mesma.

Dentre os métodos estatísticos disponíveis para resolver problemas de análise de mistura, os métodos de análise de fator (FA, *factor analysis*), análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) e decomposição em valores singulares (SVD, *Singular Value Decomposition*) desempenham papéis importantes especialmente na identificação do número de espécies que contribuem significativamente para a variância dos dados experimentais (MENDIETA et al., 1998). As soluções matemáticas podem ser transformadas em soluções físicas por meio de métodos de resolução de curvas multivariadas (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) (TAULER, 1995).

O objetivo da utilização destes métodos quimiométricos foi investigar o comportamento cinético da substância carajurina, uma desoxiantocianidina isolada das folhas da *A. chica*, assim como do extrato etanólico bruto da mesma planta frente à decomposição por radiação UV a diferentes valores de pH no decorrer de um período de 24 horas. O objetivo de estudar um extrato bruto é avaliar como substâncias presentes (flavonóides, co-pigmentos e açúcares livres) podem afetar a estabilidade das desoxiantocianinas também presentes. O resultado obtido pode ajudar no desenvolvimento de metodologia para a determinação do número de espécies presentes em extratos assim como numa primeira elucidação do mecanismo da degradação cinética da carajurina.

Para avaliar a estabilidade dos diferentes extratos contendo as desoxiantocianidinas, as medidas de absorbância são usadas para construir gráficos do logaritmo neperiano ($\ln$) da razão absorbância (A) / absorbância inicial (A_0) ($\ln A/A_0$) *versus* tempo. Através da inclinação da reta obtém-se o valor k , representando a velocidade de degradação das substâncias. A partir dos valores obtidos de k , são calculados os valores do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) por meio da relação $t_{1/2} = -\ln 0,5/k$, sendo os valores obtidos usados como parâmetros para estimar a estabilidade ante a ação da luz (IACOBUCCI e SWEENEY, 1983).

I.2.7. Métodos quimiométricos

Com os recursos analíticos atuais, a análise de amostras fornece muitas informações que são melhor manipuladas com o uso de ferramentas e programas computacionais que ajudam na interpretação destas informações.

O termo *Análise Multivariada* é o uso de vários métodos que utilizam simultaneamente muitas variáveis simultaneamente para a interpretação dos dados obtidos. Os objetos químicos são amostras analíticas de interesse. As variáveis estão relacionadas com os constituintes químicos nos objetos, por exemplo, concentrações de elementos mais importantes, altura de picos em perfis cromatográficos ou comprimentos de onda em perfis espectroscópicos. Os métodos multivariados podem ser classificados em diferentes categorias dependendo da quantidade de informação que se tem sobre a amostra. Dentre os métodos, o PCA e a SVD, são utilizados com maior frequência na compreensão, interpretação e na extração da informação dos dados. O PCA é um método baseado na decomposição de um conjunto de dados, enquanto que o método de Análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA, *Multi-way Principal Components Analysis*) pode ser aplicado para se analisar a similaridade entre diferentes conjuntos de matrizes de dados (WISE et al., 2006).

O posto (*rank*) de uma matriz de dados vai ser igual ao número de espécies espectrometricamente ativas. Já o posto de uma matriz de espectros de massas bidimensional, será igual ao número de espectros diferentes gerados a partir dos fragmentos iniciais. Por exemplo, se uma espécie produz 10 espectros diferentes o posto será igual a 10. No entanto, quando é analisado um conjunto de amostras ao mesmo tempo, o posto pode ser igual ou menor ao encontrado para a matriz de dados do componente puro. Métodos como a aproximação da variável pura (PURE) (WINDIG et al., 2005) auxiliam a encontrar as estimativas de espectros e perfis cinéticos. Este método seleciona as colunas com as variáveis mais puras, baseando-se no método SIMPLISMA (*Simple-to-use interactive mixture analysis*) (CAO et al., 2005). O resultado após a utilização destes métodos pode ser um ponto inicial para a determinação de espectros dos componentes puros. Para obtenção de informações adicionais utiliza-se o método Resolução Multivariada de Curvas (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) (TAULER et al., 1995). No MCR deve-se inicialmente

estimar o posto da matriz total de espectros, que deve ser igual ao número de espécies analisadas nas misturas. O MCR é um método que obtém os valores de concentração das amostras, assim como os espectros puros dos componentes dentro da amostra a partir de uma matriz de dados que contém as variáveis analíticas.

I.2.7.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

O PCA é uma técnica estatística multivariada usada para reduzir a dimensão de um conjunto de dados. Ela é baseada na correlação da matriz de covariância, onde a matriz de dados A consiste de n objetos (espectros) representados por p variáveis (absorbâncias obtidas em diferentes comprimentos de onda). O PCA decompõe a matriz A em três matrizes, onde T é a matriz *score*, P é a matriz de *loading* e E é a matriz residual. O número de fatores que descreve a maior parte da variância dos dados é representada por q , sendo P^t a matriz transposta de P . Cada fator corresponde a uma linha ou coluna das matrizes T ou P , respectivamente (BEEBE et al., 1998).

$$A = T_{n \times q} P_{q \times p}^t + E_{n \times p}$$

I.2.7.2. Análise de Componentes Principais Multi-modo – MPCA

Em MPCA (PEREIRA-FILHO et al., 2002), o tensor é decomposto por uma somatória dos produtos dos vetores dos *score* e matrizes dos *loading* mais o arranjo residual que é minimizado no sentido dos quadrados mínimos. A decomposição é feita em concordância com os princípios do ruído ou parte residual e é associada com a variação não determinística nos dados. A parte sistemática, a soma dos vetores dos *scores* e das matrizes dos pesos, expressa a *variação determinística* como uma parte (*score*) relacionada somente com as amostras e a segunda parte (pesos) relacionada com as variáveis e seus tempos de variação. MPCA é equivalente a se aplicar PCA em uma matriz bidimensional ampla, formada

pelo desdobramento do arranjo tridimensional em um dos seis modos possíveis, onde somente três desses são essencialmente diferentes.

A matriz $\underline{X}$ (**Figura 7**) é decomposta como a somatória do produto dos vetores dos *score* (t) e as matrizes dos *loading* (P) somada a matriz de resíduos (E) que é minimizada no sentido dos mínimos quadrados.

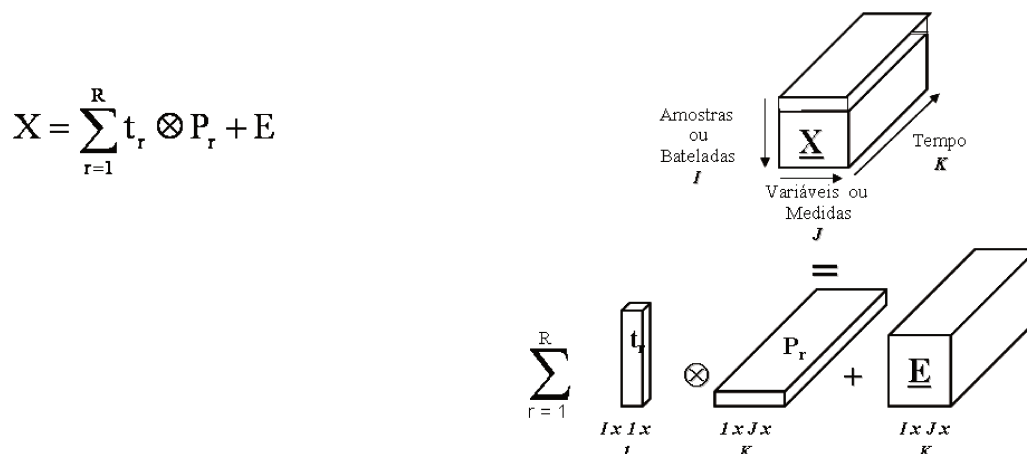


Figura 7. Arranjo de dados tridimensional e sua decomposição por MPCA e equação utilizada para representar a decomposição por MPCA.

I.2.7.3. PURE

O método SIMPLISMA ou PURE seleciona a variável mais pura com base na determinação do ângulo máximo entre as variáveis pelo cálculo do ângulo máximo gradual. Assim, a variável pura assume a presença de variáveis como comprimentos de onda. Como resultado, as intensidades de uma variável pura são proporcionais às concentrações desse componente.

I.2.7.4. Resolução Multivariada de Curvas (MCR)

A Resolução Multivariada de Curvas é um método quimiométrico incluído na família de técnicas de análise de fatores, FA. Seus principais objetivos são o isolamento, resolução (o que traz informação qualitativa) (TAULER et al., 1995) e quantificação das fontes de variação em um determinado conjunto de dados.

Todos os métodos de resolução decompõem matematicamente uma resposta de mistura em contribuições puras devido a cada componente do sistema. Essa resposta de mistura é organizada numa matriz D contendo a informação bruta dos componentes presentes no conjunto de dados. Os métodos de resolução permitem a decomposição dos dados de mistura (matriz D) em produtos de duas matrizes C e S^T , cada um incluindo os perfis de resposta puros das n misturas ou componentes de processo associados com a direção da linha e da coluna da matriz inicial de dados, respectivamente. Na notação de matrizes, a expressão válida para todos os métodos de resolução é representada por um conjunto de dados.

$$D = CS^T + E$$

Onde $D(r \times c)$ é a matriz original de dados, $C(r \times n)$ e $S^T(n \times c)$ são as matrizes contendo os perfis de resposta pura relacionados com a variação dos dados na direção da linha e da coluna respectivamente, e $E(r \times c)$ é a matriz de erro, ou seja, a variação residual do conjunto de dados que não é relacionado com nenhuma contribuição química. Os parâmetros r e c são os números de linhas e colunas da matriz de dados originais, e n é o número de componentes químicos na mistura. C e S^T frequentemente se referem a perfis de concentração e espectros (JUAN e TAULER, 2003).

O objetivo principal da MCR é o isolamento, resolução e quantificação das fontes de variação de um determinado conjunto de dados. A característica mais importante desta técnica é que não é necessário informação da contribuição dos diferentes fatores na resposta final (MENDIETA et al., 1998). O MCR é usado no programa MatLab® (TAULER et al., 2005; JUAN e TAULER, 2006).

O MCR é uma ferramenta que pode auxiliar no tratamento e interpretação de dados provenientes de análises mais simples tais como fotodegradações monitoradas por espectrofotometria na região UV-Vis (MAS et al., 2008) ou como análises de dados mais complexos provenientes de técnicas hífenadas.

I.2.7.5. Análise Discriminante com Calibração Multivariada PLS-DA

PLS-DA (Quadrados Mínimos Parciais ou do inglês, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) é um método de classificação de amostras baseado

no modelo PLS, que modela a relação entre duas matrizes, o conjunto de dados obtidos através de medições e a matriz da classe de afiliação. O algoritmo decompõe as matrizes usando um determinado número de variáveis latentes tal que uma máxima separação de classes seja obtida. Os grandes números de picos dos espectros que são potenciais marcadores criam um modelo e em cima dele são feitas validações. Este método é uma generalização da regressão múltipla linear e é capaz de analisar mais ruídos e dados incompletos (CIOSEK et al., 2005; BARKER et al., 2003).

I.3. *Arrabidaea chica* – MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos utilizados na caracterização das 3-desoxiantocianidinas de *Arrabidaea chica* foram cromatografia líquida associada a um detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) ou a um detector sequencial de massas (LC-MS/MS), usando uma fonte de eletronebulização (ESI, *electrospray ionization*). Também foi empregada a infusão direta dos extratos no sistema MS/MS.

Os extratos foram purificados utilizando extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) antes das análises. A purificação dos extratos, usando cartuchos de sílica C18, é um procedimento relativamente simples, o qual permite a eliminação de substâncias polares e impurezas não-fenólicas em uma única etapa. O procedimento envolve a aplicação de extratos ricos em desoxiantocianidinas seguido de eluição com solventes. Metanol acidificado é o recomendado e foi utilizado neste trabalho para a eluição das desoxiantocianidinas. A acidificação é necessária para prevenir a oxidação dessas substâncias, exatamente como acontece com as antocianinas (LEE, 1992).

I.3.1. HPLC-DAD

É uma técnica muito usada na determinação química qualitativa e quantitativa de compostos instáveis de elevada massa molecular. Por essa razão se tornou uma das técnicas principais para separação de antocianinas. A técnica emprega colunas fechadas, recheadas com uma fase sólida, e uma fase móvel eluída a altas pressões. A técnica promove a realização de separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras em poucos minutos e com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

I.3.2. LC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry)

É uma técnica largamente usada que combina a capacidade de separação do HPLC com a sensibilidade e especificidade da caracterização

estrutural e detecção da espectrometria de massas (MS) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Esta técnica foi explorada antes na caracterização de antocianidinas (MACZ-POP et al., 2006) assim como para outros tipos de substâncias como colesterol (MAZALLI et al., 2006) e isoflavonas (AGUIAR et al.; 2007).

I.3.3. ESI-MS/MS (Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry)

A ionização por *electrospray* é uma técnica usada em espectrometria de massas para produzir íons a partir de moléculas. ESI promove pouca fragmentação de íons e é uma característica vantajosa no sentido de que o íon molecular é preservado. Infelizmente pouca informação estrutural pode ser obtida com o simples espectro de massas, no entanto a utilização de ESI acoplada com espectrometria de massas *tandem* (ESI-MS/MS) pode ser utilizada para obtenção dos fragmentos e possíveis elucidações de moléculas.

Neste trabalho esta técnica foi utilizada devido à falta de disponibilidade de padrões comerciais de substâncias do tipo 3-desoxiantocianidinas. Foram utilizados dados de fragmentação de íons M^+ assim como comparação com dados de literatura.

I.3.4. Fingerprinting – Caracterização por ESI-MS

Impressão digital ou *fingerprinting* utilizando espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) é uma técnica rápida e versátil de mapeamento de misturas de compostos orgânicos e inorgânicos provenientes de plantas silvestres e medicinais. A técnica já foi utilizada para análise de própolis (SAWAYA et al., 2004), whisky (MOLLER et al., 2005), cerveja (ARAÚJO et al., 2005), óleos essenciais (MOLLER et al., 2007) entre outros e também na diferenciação do nível de amadurecimento de frutas (AMORIM et al., 2009). Foi também usada no controle de qualidade de óleos fixos e voláteis (MARQUES et al., 2006; SARAIVA et al., 2009; LAW et al., 2010). Por fim foi também usada na caracterização de frutas chilenas onde várias antocianinas e suas capacidades antioxidantes foram identificadas (RAMINEZ et al., 2015). A técnica demanda pouca

preparação de amostras e também pouca quantidade de amostra e resulta em informação composicional imediata dos compostos ionizáveis por ESI. A mistura de analitos é inserida através de infusão direta, permitindo a identificação de marcadores químicos que podem ser utilizados para caracterizar extratos. Os dados de ESI-MS foram tratados usando PLS-DA para avaliar se a ferramenta diferencia as variedades de *A. chica*.

I.3.5. Fluorescência de Raios-X

A utilização da técnica de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF, do inglês *Energy dispersive X-ray fluorescence*, ou FRX) consiste de fonte de raios-X e de detector semicondutor e seu uso para estudo de espécies orgânicas é recente. A técnica consiste em auxiliar na identificação e quantificação das espécies, com baixo custo operacional e de forma não destrutiva da amostra. É fundamentada no fenômeno fotoelétrico, que consiste em excitar átomos com uma fonte de energia que seja capaz de remover elétrons de orbitais internos.

Além do fenômeno fotoelétrico, que ocorre de forma específica para cada elemento, existem outras interações concomitantes entre os raios-X e a amostra. Entre elas, podemos mencionar os efeitos Compton e Rayleigh, causados por espalhamento da radiação, em vez de absorção e emissão. O “espalhamento” acontece quando fótons se chocam com moléculas de uma amostra que por sua vez tem seus átomos ligados por forças de origem elétrica. Podemos considerar dois tipos de espalhamento. Se a molécula, no choque, se comporta como uma esfera rígida, sem movimentos internos, o fóton espalhado conserva praticamente toda a energia inicial que tinha antes do choque. Esse tipo de espalhamento é chamada de “espalhamento elástico” ou Rayleigh, e é o mais comum quando fótons incidem sobre moléculas. Alguns fótons, ao se chocarem com uma molécula, podem dar início a algum movimento dos átomos da molécula, o fóton “excita” a molécula, cedendo a ela parte de sua energia inicial. A energia do fóton, depois do espalhamento, é menor que a inicial pois parte dela foi usada para chacoalhar a molécula. Esse é um “espalhamento inelástico” ou Compton, com troca de energia entre o fóton e a molécula. O espalhamento Raman é um tipo de espalhamento inelástico

O processo Raman pode produzir fóton com energia maior ou menor que a energia do fóton incidente. Quando a energia do fóton diminui, gerando uma vibração da molécula, o processo é chamado de Stokes, por razões históricas. No outro caso, em que a energia do fóton aumenta, roubando energia de vibração da molécula, o processo é chamado de anti-Stokes

Após bombardeamento de raios-X sobre uma amostra e coleta de fotoelétrons por ela emitidos, discriminados por diferença de energia de cada pico de fluorescência, a radiação eletromagnética incidente interage com a amostra podendo ocorrer absorção, emissão e espalhamento desta radiação eletromagnética. Um gráfico de contagem de elétrons vs. energia cinética é estabelecido por varredura de um intervalo de energia e um espectro de FRX é obtido, o qual permite identificar os elementos químicos presentes na amostra, podendo-se assim conhecer mais sobre ela (ARAÚJO et al., 2005). A técnica já foi usada para determinação de metais em espécies orgânicas e para caracterização de espécies orgânicas (Carvalho et al., 2005; Alexandre, 2007) dentre outros.

Para amostras com átomos de números atômicos médios e/ou altos, os coeficientes de absorção de raios-X são consideráveis (caso de metais) e a radiação é pouco espalhada, resultando num efeito Raman desprezível. Quando a matriz da amostra é constituída por átomos leves (principalmente por C, O e N, caso das amostras orgânicas) ocorre um aumento da intensidade do espalhamento. Alguns autores (BORTOLETO et al., 2005; BUENO et al., 2005; VERBI et al., 2005) observaram que a região de espalhamento Raman também poderia fornecer informação importante para amostras orgânicas em análises não-destrutivas, principalmente utilizando técnicas quimiométricas combinadas.

O objetivo do uso desta técnica aliada à quimiometria para análise das folhas de *A. chica* foi avaliar seu potencial na diferenciação das variedades da espécie. Os espectros obtidos foram tratados quimiometricamente utilizando-se o software Unscrambler versão 9.2 da CAMO[®], usando-se a ferramenta de análise de componentes principais (PCA) para a discriminação dos dados.

Neste trabalho o material analisado por essa técnica foram as folhas de 3 variedades conhecidas da *A. chica* colhidas em diferentes locais, épocas do ano e períodos do dia. A análise teve como objetivo principal a diferenciação entre as variedades das plantas.

I.4. Extração com Fluido Supercrítico

A extração com fluido supercrítico é uma alternativa aos métodos de extração convencionais como extração sólido-líquido (SLE) e extração líquido-líquido (LLE) que utilizam grandes quantidades de químicos nocivos como solventes clorados. A extração com fluido supercrítico é considerada tecnologia limpa e não poluente, e tem sido frequentemente utilizada com o objetivo de recuperar princípios ativos de produtos naturais: descafeinização de cafés e chás, extração de pigmentos, aromas, antioxidantes, temperos e outros (MODEY et al., 1996; AZEVEDO et al., 2003; KOPCAK, 2003; AZEVEDO et al., 2008; CASAS et al., 2009; SILVA et al., 2009; CASTRO-VARGAS et al., 2010). Os fluidos no estado supercrítico possuem densidades próximas de líquidos, viscosidades próximas de gases e difusividades intermediárias, estas características tornam estes solventes atrativos para os processos de extração. O princípio da tecnologia se baseia no fato de que próximo ao ponto crítico do solvente propriedades como densidade e capacidade de solubilidade variam enormemente com pequenas mudanças nas pressões e temperaturas do processo, possibilitando a fácil recuperação dos solutos com pequenas mudanças nestas variáveis. A boa eficiência destas extrações a altas pressões são uma perspectiva para novos processos ou para otimização de rotas de produção já existentes (MENDIOLA et. al, 2013).

O gás carbônico supercrítico é o fluido mais utilizado em extrações supercríticas por apresentar condições críticas moderadas (31,1 °C e 73,8 MPa), além de ser comercialmente disponível com alto grau de pureza. Ele também não é tóxico, é inflamável e é estável quimicamente. No entanto, o sucesso do uso da tecnologia depende fortemente da solubilidade das substâncias pouco voláteis em gás carbônico supercrítico, um fluido não polar, com baixa afinidade às substâncias polares.

Para aumentar a polaridade do fluido supercrítico, podem ser utilizadas em combinação, pequenas quantidades de co-solventes polares, embora neste caso corra-se o risco de diminuir a seletividade do fluido supercrítico. O uso de co-solventes pode aumentar a interação entre soluto e as moléculas do solvente aumentando assim a solubilidade geral, além de poder aumentar a temperatura crítica da mistura dos solventes quando comparada com o solvente puro (BRUNNER, 1983, 1984). O uso de co-solventes já foi explorado em extrações de

óleo a partir de grãos de café verde (etanol e álcool isopropílico) com aumento sensível do rendimento, seu uso propiciou um aumento de interações intermoleculares e um aumento da densidade do solvente (ALEXANDRE, 2007). Neste caso os solventes mostraram maior afinidade para com o óleo do que para com a cafeína e ácidos clorogênicos. Também foram observados aumento de rendimento com o uso de etanol na extração a partir de sementes de goiaba (CASTRO-VARGAS et al., 2010), dentre outros.

Paula et al. (2013) descrevem a extração das folhas de *A. chica* usando dióxido de carbono supercrítico numa primeira etapa e uma mistura de CO₂/etanol/água numa segunda etapa de extração. HPLC foi usada para quantificar carajurina nos extratos. Concluiu-se que o uso de CO₂ supercrítico foi seletivo para extrair a carajurina e que a presença de água na mistura de solventes foi essencial para combinar extração e recuperação de compostos de interesse. O artigo de Paula et al. (2013) foi publicado depois da investigação da técnica de CO₂ supercrítico descrita no item I.3 deste trabalho, ambas foram experiências diferentes e positivas em relação ao uso da técnica de fluido supercrítico.

I.5. OBJETIVO

I.5.1. Objetivo geral

Obtenção de extratos de folhas de *Arrabidaea chica* com princípios químicos corantes e atividade biológica.

I.5.2. Objetivos Específicos

Capítulo II: Obtenção de extratos da folha da *Arrabidaea chica* com elevados teores de desoxiantocianidinas utilizando diferentes técnicas extrativas e de purificação

- Otimizar condições para a obtenção de extratos da folha de *A. chica* com elevados teores de desoxiantocianidinas, utilizando para tanto, diferentes técnicas extrativas e de purificação como: SPE, fluido supercrítico
- Caracterizar os extratos de *A. chica* utilizando técnicas de espectrometria de massas e fluorescência de raios-x.

Capítulo III: Atividade biológica de extratos das folhas da *Arrabidaea chica*

- Avaliar as atividades antimicrobiana de extratos contra cepas de dermatófitos de gêneros de *Trichophyton* e *Microsporum genera* e cicatrizante a partir de folhas da *A. chica*. Caracterizar os extratos ativos por LC-MS/MS.

Capítulo IV: Influência da radiação e do pH no comportamento cinético em extratos das folhas da *Arrabidaea chica* contendo desoxiantocianidinas

- Obter extratos das folhas de *A. chica* estáveis frente à exposição à luz com atividade biológica e/ou grande potencial de uso como corante utilizando UV-vis.

Capítulo II: Obtenção de Extratos da Folhas de *A. chica*
com Elevados Teores de Desoxiantocianidinas
Utilizando Diferentes Técnicas Extrativas e de
Purificação

II.1. Obtenção e Caracterização de extrato rico em 3-desoxiantocianidinas (3DAE) e substância S-3 a partir das folhas da *A. chica*

Foi desenvolvido um método simples e direto para obtenção de um extrato rico nas substâncias 3-desoxiantocianidinas existentes nas folhas de *A. chica* assim como para obtenção de extrato concentrado (**S-3**), uma das 3-desoxiantocianidinas encontradas na planta. A variedade da *A. chica* avaliada foi a mais comum encontrada no país, conhecida como variedade I, segundo a Embrapa Amazônia Ocidental.

II.1.1. Material e Métodos

II.1.1.1. Planta

As folhas da *A. chica* podem se diferenciar entre si de acordo com sua variedade. A Embrapa Amazônia Ocidental e alguns autores brasileiros descrevem a existência de três variedades da espécie na Amazônia (BARROS et al., 2008). A variedade utilizada neste trabalho foi da variedade I. O material utilizado neste trabalho foi cultivado em Maringá, estado do Paraná. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, Unicamp, número de registro UEC 145.956.

As folhas foram secas na sombra e depois em estufa a 40 °C por 8 horas. Antes da utilização das mesmas para preparação de extratos, as folhas foram moídas num moedor de plantas e depois peneiradas utilizando peneiras de mesh 150 e 210 µm. A fração retida entre as peneiras foi utilizada para os experimentos.

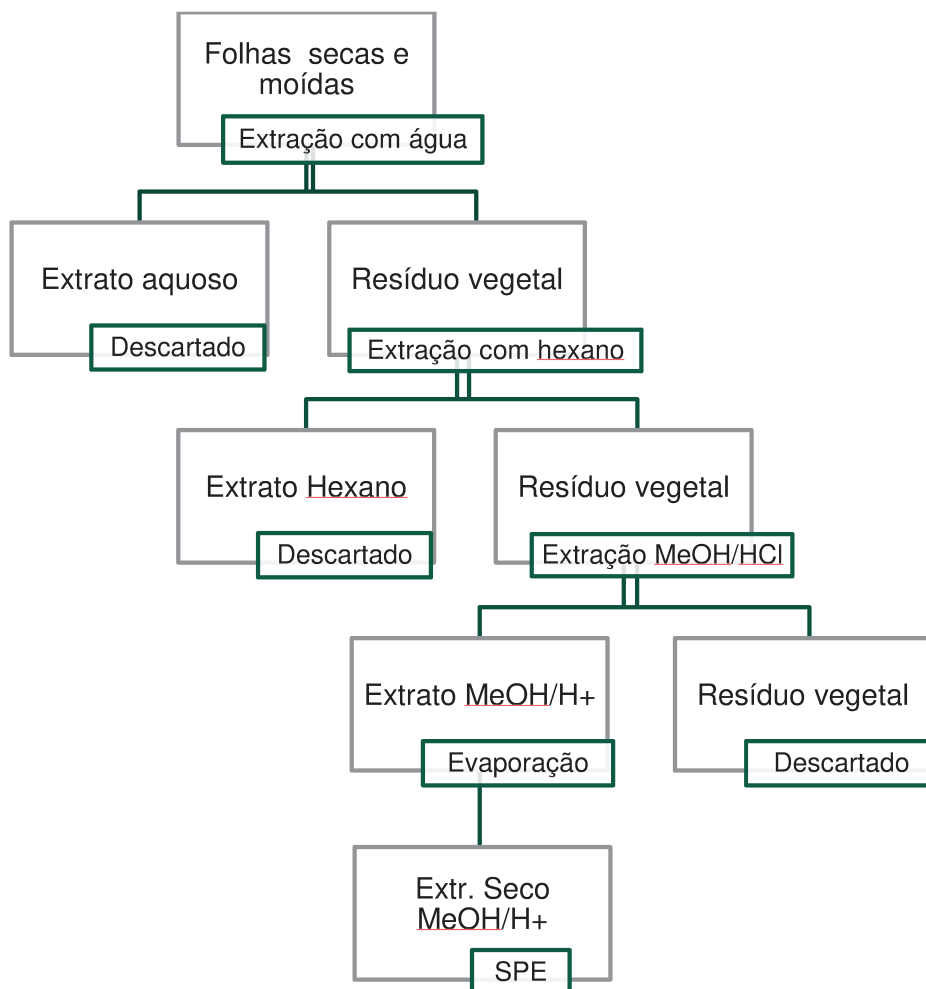
II.1.1.2. Solventes utilizados nas extrações

Foram utilizados nas extrações os seguintes solventes: álcool etílico P.A., Vetec® e Synth®. Diclorometano P.A., clorofórmio P.A., hexano P.A., acetato de etila P.A., metanol P.A., acetona P.A. e ácido clorídrico concentrado P.A. Synth®, ácido fórmico 50% HPLC e ácido fosfórico 50% HPLC Fluka, e dimetilsulfóxido Sigma-Aldrich.

II.1.1.3. Obtenção de extrato rico em 3-desoxiantocianidinas das folhas da *A. chica*

Foram utilizada sequencia de 3 solventes: água, solvente polar para eliminação dos açúcares, hexano, solvente apolar para eliminação das substâncias apolares não desejáveis e finalmente metanol acidificado para extração dos compostos polares de interesse.

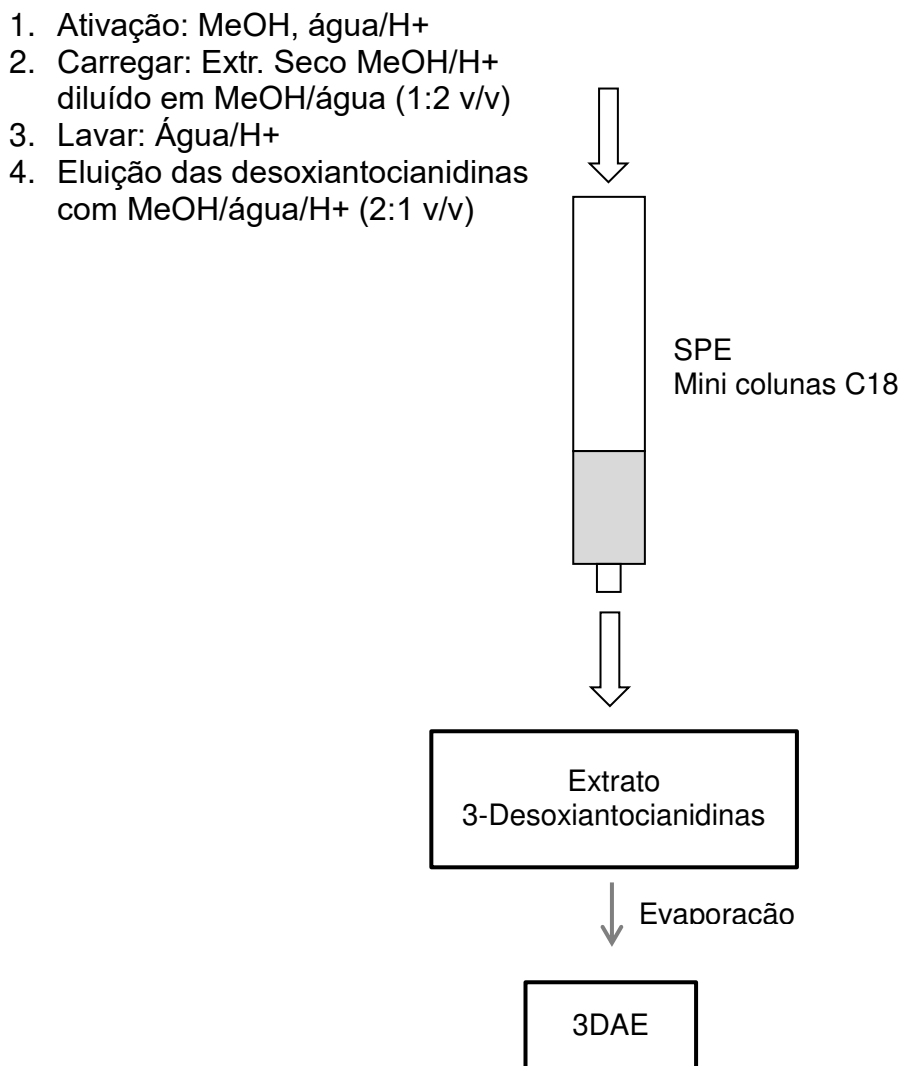
Folhas moídas de *A. chica*, 50 g, preparadas conforme descrito no item II.1.1.1., foram maceradas utilizando uma sequência de três solventes, água (500 mL), hexano (3 x 500 mL, 15 min) e metanol contendo 0,01 % de solução de ácido clorídrico, MeOH/HCl, (1 x 500 mL, 15 min). As extrações foram realizadas a frio e com agitação constante e a cada mudança de solvente, o anterior era evaporado das folhas antes de iniciar uma nova extração. Após a extração com água o resíduo vegetal foi seco em estufa (40 °C, 10 h), após a extração com hexano o solvente foi evaporado do resíduo vegetal utilizando-se ventilação natural dentro de uma capela. O último extrato de MeOH/HCl foi concentrado num rota-evaporador resultando num extrato concentrado, denominado de MeOH/H⁺, rendimento de 1,3 %. Os extratos aquoso e hexânico foram descartados.



O extrato MeOH/H⁺ foi purificado utilizando-se extração em fase sólida (solid phase extraction – SPE) resultando num extrato rico em 3-desoxiantocinidinas, denominado 3DAE, conforme descrito a seguir.

Mini-colunas Sep-Pak C18 (Waters Associates, Milford, MA) foram utilizadas para purificação do extrato MeOH/H⁺. As mini-colunas foram previamente ativadas passando-se metanol e em seguida solução aquosa de 0,01 % de ácido clorídrico (LEE et al., 2004). O extrato MeOH/H⁺ foi previamente diluído em metanol/água na proporção de (1:2 v/v) e inserido nas mini-colunas onde o extrato foi retido. Uma quantidade equivalente a três volumes da mini-coluna em solução de ácido clorídrico a 0,01 % foram passados pela coluna com o objetivo de eluir açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e outros compostos solúveis em água. Depois deste procedimento, as 3-desoxiantocianidinas (retidas na coluna) foram extraídas dos demais compostos fenólicos eluindo uma solução de metanol/água (2:1 v/v)

contendo solução de ácido clorídrico a 0,01 %. A fração resultante extraída foi concentrada usando-se rota evaporador a vácuo e banho-maria a 35 °C, resultando num extrato denominado de 3DAE.



O extrato purificado, 3DAE, foi filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore Corp., Bedford, MA) com o objetivo de remover particulados antes da injeção na coluna de HPLC. O Extrato 3DAE foi analisado por CCD, HPLC-DAD, ESI-MS e HPLC-MS/MS.

II.1.1.4. Caracterização do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas, 3DAE

II.1.1.4.1. Análise utilizando cromatografia de camada delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada foi realizada utilizando-se placas analíticas de sílica gel (Merck, Darmstadt, Germany). Uma pequena quantidade do extrato foi diluída em Metanol / ácido clorídrico e aplicada na placa que foi eluída utilizando-se 2 sistemas de solventes separados (um após o outro): clorofórmio:acetona:ácido fórmico (7,5:1,6:0,8; v/v/v) e ácido clorídrico:ácido fórmico:água (3:3:4; v/v/v) até que a mistura de solventes atingisse uma altura de 7 cm da placa analítica. Após a eluição, as placas foram secas ao ar e reveladas com reagente NP-PEG (difetilboriloxietilamina e polietilenoglicol) (WAGNER et al., 1986) e reveladas por luz UV 254nm. A separação do extrato 3DAE contendo as substâncias **S-1**, **S-2** e **S-3** pode ser observada na **Tabela 1**, página 66, onde são apresentados os valores médios de R_f destas substâncias.

II.1.1.4.2. Análise utilizando-se HPLC-DAD

As análises foram realizadas num equipamento Shimadzu Prominence equipado com um sistema de bombeamento LC-20 AT, um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A, software Shimadzu LCsolution v.1.21 e um amostrador automático SIL-20A com 20 µL de loop de injeção. A coluna utilizada da Waters (Milford, MA) X-Terra RP18 híbrida (polímero e sílica) 250 x 4.6 mm d.i., 5 µm, acoplada a uma coluna de proteção com as mesmas características, 20 x 4.6 mm d.i., 5 µm, e à temperatura ambiente. Os eluentes usados foram (A) solução de ácido fosfórico pH 1,65 e (B) metanol grau HPLC. As 3-desoxiantocianidinas foram separadas usando-se gradiente linear de 40 % B (0 min) a 52 % B (16 min), depois a 40 % B (18 min) e 40 % B (19 min). A vazão dos eluentes utilizada foi de 1 mL/min. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 600 nm e a determinação dos picos feita baseada em literatura (ZORN et al., 2001; DEVIA et al., 2002) e dados espectrais. Resultados e discussão no item **II.1.2.1**.

II.1.1.4.3. Análise por ESI-MS e ESI-MS/MS

Um espectrômetro de massa Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) acoplado a uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) foi usado para realizar as análises de ESI-MS e ESI-MS/MS. Os dados foram obtidos no modo de íon positivo. A fonte do ESI foi condicionada a 100 °C numa temperatura de dessolvatação de 100 °C, voltagem capilar entre 3 a 4 kV e energia do cone entre 20 a 40 eV. O extrato 3DAE foi dissolvido em metanol e acidificado com 7 % de ácido fórmico e injetado diretamente numa velocidade de 10 µL / min na fonte de ESI. Os íons M⁺ correspondentes aos três cátions das 3-desoxiantocianidinas (**Figura 5**) foram selecionados e fragmentados usando-se ESI-MS/MS usando energia de colisão de 15 a 35 eV. Resultados e discussão no item **II.1.2.3**.

II.1.1.4.4. Análise utilizando-se HPLC-MS/MS

Um sistema HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) acoplado em *tandem* a um espectrômetro de massa Q-Trap (Applied Biosystem, Canada) foi usado para identificar as 3-desoxiantocianidinas presentes no extrato 3DAE. A mesma coluna, fluxo e volumes de injeção usados no HPLC-DAD foram usados aqui (Item **II.1.1.4.2**). Os eluentes usados foram (A) solução de ácido fórmico pH 1,65 e (B) metanol grau HPLC. Eluição isocrática de 35 % B. As análises foram conduzidas usando ESI no modo positivo. O fluxo total do eluente do sistema de HPLC foi direcionado para a fonte de ESI através de um *splitter* 20 µL. A voltagem do capilar usada foi de 5,5 kV; gás nebulizador (N₂) a 60 psi; cortina de gás (N₂) a 25 psi a energia de colisão da célula de 15 eV. A temperatura do forno do *eletrospray* foi condicionada a 200 °C e pressão do gás de aquecimento a 75 psi. Resultados e discussão no item **II.1.2.2**.

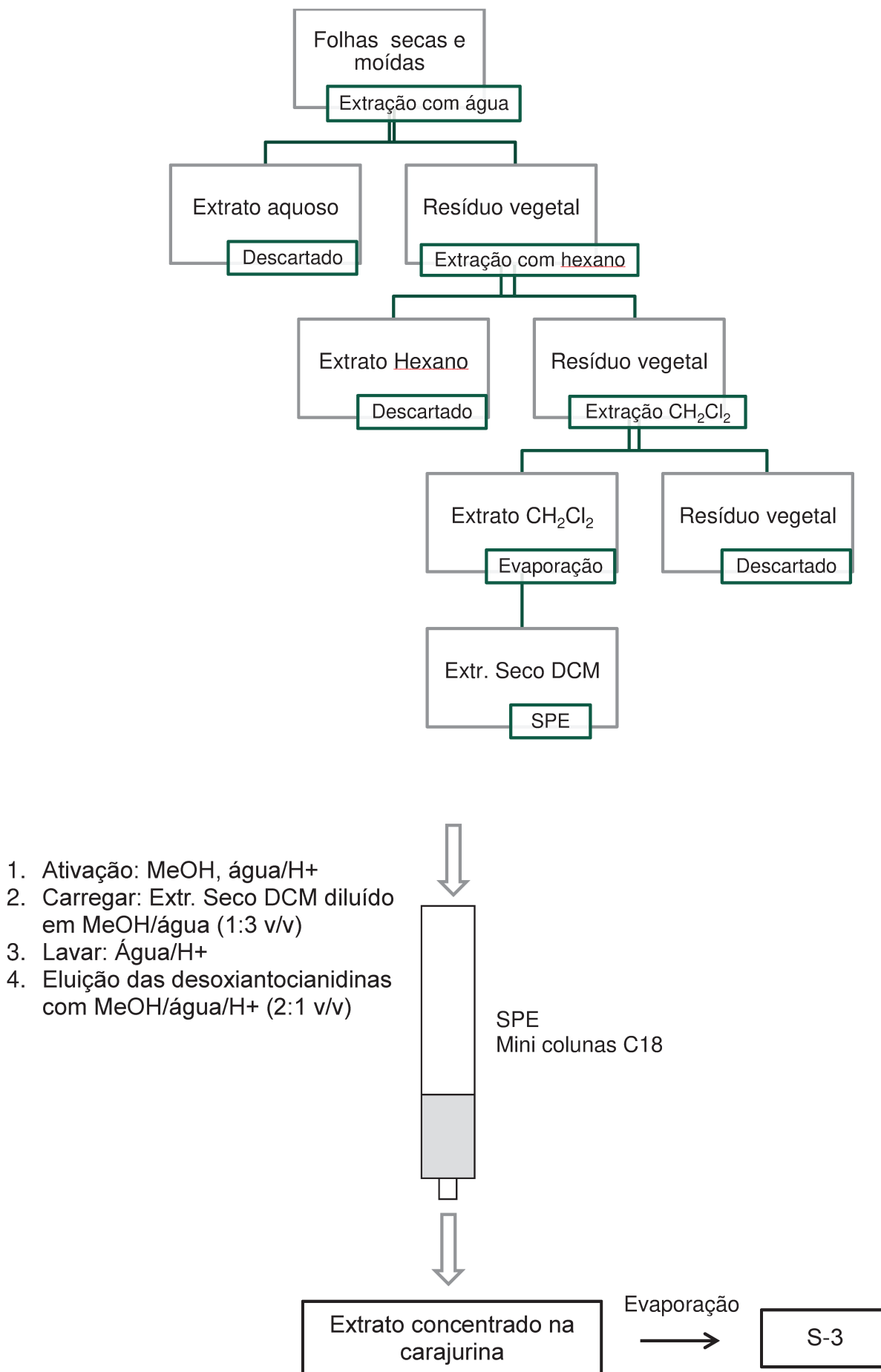
II.1.1.5. Obtenção da **S-3**, íon 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílico

A substância **S-3** foi obtida utilizando procedimentos mais diretos que os descritos previamente por Zorn et al. (2001) e Devia et al. (2002). Zorn et al. (2001) utilizaram um fracionamento guiado por análises biológicas seguido por extração em coluna cromatográfica utilizando duas fases estacionárias diferentes e SPE

para obter as substâncias isoladas. Devia et al. (2002) usaram extração com solventes, HSCCC (cromatografia em contra corrente de alta velocidade) e coluna cromatográfica usando combinação de fases estacionárias para obtenção das substâncias isoladas.

Descrição da obtenção de **S-3** utilizando método direto

Folhas moídas de *A. chica*, 50 g, preparadas conforme descrito no item II.1.1.1., foram extraídas durante 24 horas usando maceração sequencial com agitação constante em água, hexano (3 x 500 mL, 15 min) e diclorometano (1 x 500 mL, 15 min). Após a primeira maceração, a água foi removida secando-se as folhas em estufa (40 °C, 10 h). Após a maceração com hexano, após filtradas, o solvente foi removido numa capela. Após a extração com diclorometano, a fração foi concentrada em rota evaporador até ficar totalmente livre de solvente, denominado extrato DCM. O extrato DCM foi purificado utilizando-se mini-colunas de Sep-Pak C18. As mini-colunas foram inicialmente ativadas com metanol seguido de solução de ácido clorídrico a 0,01 %. Antes da introdução nas mini-colunas, o extrato DCM (aprox. 1,1 g) foi diluído em metanol:água (1:3 v/v) e inserido na mini-coluna pré ativada onde o extrato foi retido. Três volumes equivalentes da coluna em ácido clorídrico a 0,01 % foram utilizados para eluir os açúcares, ácidos, proteínas e outros compostos solúveis em água. A eluição do extrato e separação de compostos fenólicos foi então realizada utilizando-se metanol:água (2:1) contendo solução aquosa de ácido clorídrico a 0,01 %. O extrato eluído resultou numa fração rica no íon **S-3** (0,3 g) que foi identificada utilizando-se HPLC-DAD, ESI-MS e ESI-MS/MS.



II.1.1.6. Análise de S-3 utilizando-se HPLC-DAD, ESI-MS e ESI-MS/MS

As análises utilizando HPLC-DAD foram realizadas nas mesmas condições das análises anteriores para o extrato 3DAE (item II.1.1.4.2.).

Para as análises por ESI-MS e ESI-MS/MS, o espectrômetro de massa e as condições de análise foram as mesmas descritas para o extrato 3DAE mencionado no item II.1.1.4.3. A substância **S-3** foi dissolvida em metanol e acidificado com 7 % de ácido fórmico e diretamente injetado na fonte de ESI num fluxo de 10 µL / min. O íon M⁺ correspondente à **S-3** foi selecionado e fragmentado usando-se ESI-MS/MS e energia de colisão de 15 a 35 eV. Resultados e discussão no item II.1.2.4.

II.1.2. Resultados e Discussão

II.1.2.1. Caracterização do extrato 3DAE utilizando HPLC-DAD

A análise da fração 3DAE por HPLC-DAD resultou num cromatograma de praticamente três picos atribuídos como **S-1**, **S-2** e **S-3** com área total variando entre 95 e 98 %. A atribuição aos picos foi baseada em dados da análise de HPLC-DAD, e confirmada com as análises de ESI-MS/MS e HPLC-MS/MS (**Figura 8**). As técnicas empregadas permitem-nos dizer que todos os três picos no cromatograma da HPLC foram considerados puros já que para cada pico os espectros de UV e MS em três diferentes posições (na subida, na altura máxima e na descida do pico) apresentaram os mesmos perfis, indicando ser a mesma substância. Importante ressaltar a importância da etapa de SPE para purificação do extrato já que o extrato metanólico antes desta etapa apresentou um cromatograma de HPLC com picos das mesmas 3-desoxiantocianidinas, mas com co-eluição de impurezas. A metodologia de HPLC para caracterização de extratos é limitada, podendo apresentar variação nos tempos de retenção e resolução de picos dependendo do instrumento utilizado, da coluna, do sistema de solventes assim como de outras condições. Para tanto, foi também utilizada a técnica de HPLC-MS/MS para confirmar os valores e os dados das substâncias.

De acordo com Zorn et al. (2001), uma quarta 3-desoxiantocianidina foi encontrada nas folhas da *A. chica* (**S-4**, *m/z* 3015, **Figura 5**). No entanto, para a

variedade da planta em estudo conhecida como variedade I a **S-4** não foi encontrada.

II.1.2.2. Caracterização do extrato 3DAE utilizando HPLC-MS/MS

Nos cromatogramas de HPLC-MS/MS das amostras de 3DAE, apenas três picos foram predominantes e apresentaram tempos de retenção de 6,35; 7,72 e 10,98 min, que correspondem a **S-1**, **S-2** e **S-3** respectivamente (**Figura 8**), como demonstrados pelos picos com sinal de m/z 301, 285 e 299, respectivamente. As análises mostraram que o procedimento de extração foi efetivo na obtenção do extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas (3DAE) encontradas nas folhas da *A. chica*.

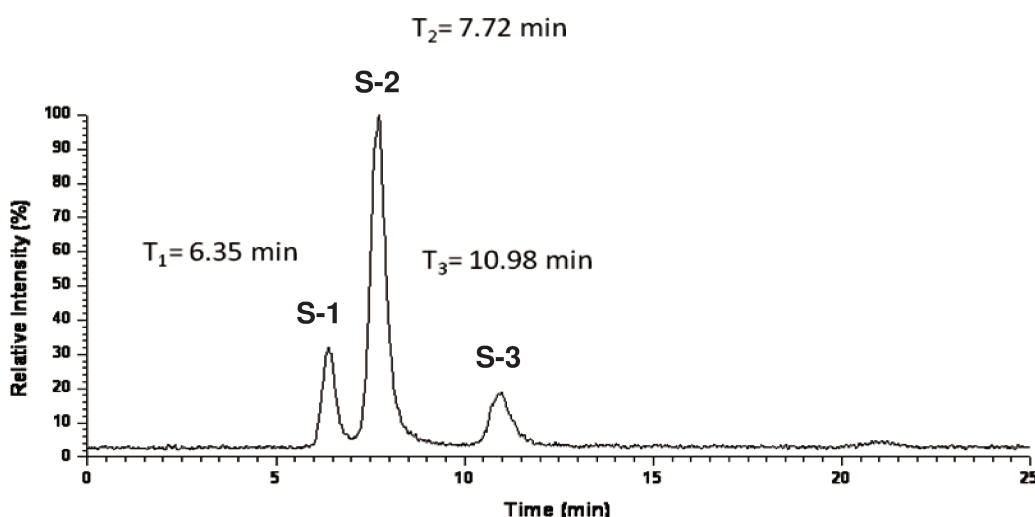


Figura 8. HPLC-MS/MS do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas (3DAE) obtido das folhas da *A. chica*. (**S-1**) m/z 301 $\rightarrow$ 286, (**S-2**) m/z 285 $\rightarrow$ 270 e (**S-3**) m/z 299 $\rightarrow$ 284.

II.1.2.3. Caracterização e perfis das 3-desoxiantocianidinas utilizando ESI-MS e ESI-MS/MS

ESI-MS é uma técnica versátil para detecção de espécies catiônicas tais como as 3-desoxiantocianidinas carregadas positivamente em pH baixo e diluídas em álcoois de baixo peso molecular, tal como metanol (BROUILLARD, 1982; TERCI e ROSSI, 2002). A **Figura 9** mostra o espectro de ESI-MS do extrato rico em desoxiantocianidinas, 3DAE, no qual todos os compostos **S-1**, **S-2** e **S-3** são

detectados nas suas formas catiônicas intactas e confirmados por medidas de m/z de alta precisão: (**S-1**) 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio, m/z 301,0697 $[M]^+$ (calculado para $C_{16}H_{13}O_6^+$ 301,0712, $E = 5$ ppm), (**S-2**) 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavílio m/z 285,0799 $[M]^+$ (calculado para $C_{16}H_{13}O_5^+$ 285,0763, $E = 13$ ppm) e (**S-3**) 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio m/z 299,0876 $[M]^+$ (calculado para $C_{17}H_{15}O_5^+$ 299,0919, $E = 14$ ppm). A qualidade e sensibilidade das análises ESI não resultaram em dissociação dos íons.

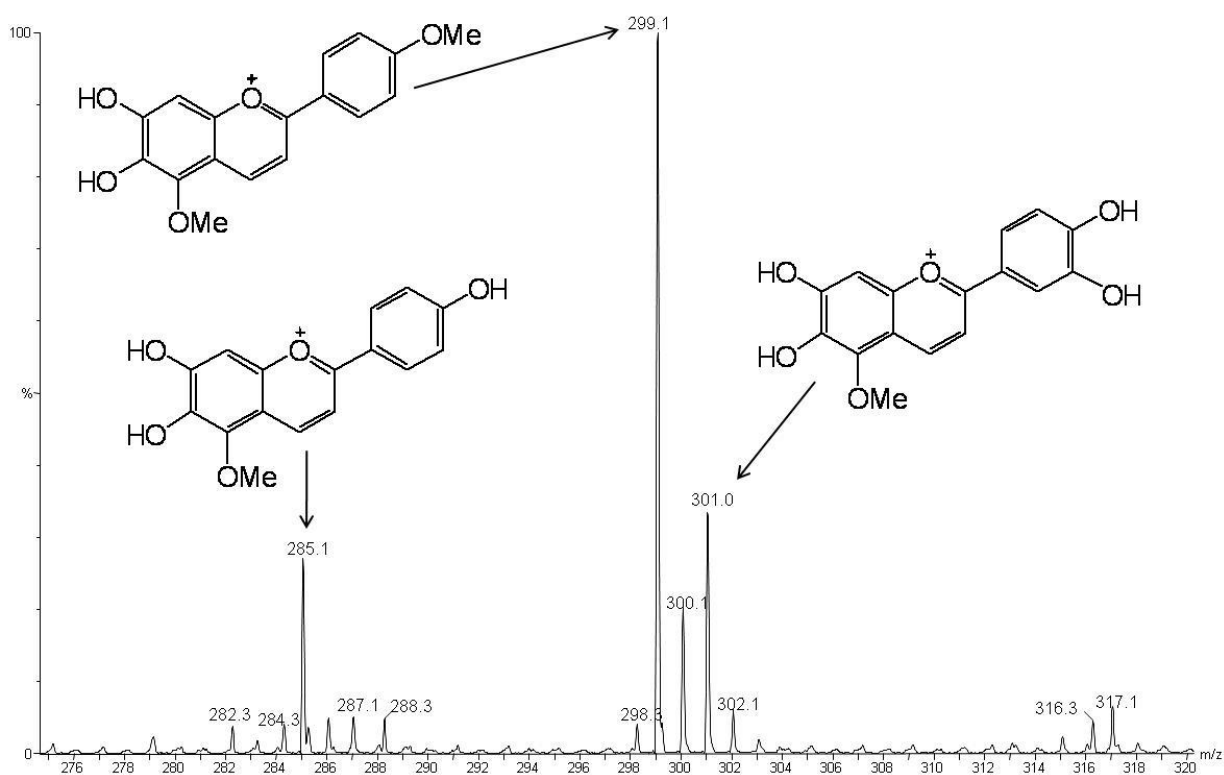


Figura 9. ESI-MS do extrato rico em 3-desoxiantocianidinas (3DAE) obtido das folhas da *A. chica*. **S-1** de m/z 301,0, **S-2** de m/z 285,1 e **S-3** de m/z 299,1.

Os experimentos de ESI(+)-MS/MS via CID (*collision induced desorption*) revelaram um padrão de fragmentação característico para os íons de desoxiantocianidinas, que apresentam como característica principal baixa dissociação e modelo de fragmentação semelhante. Os cátions do extrato 3DAE intactos foram primeiramente isolados e então fragmentados, a **Figura 10** mostra o padrão de fragmentação comum na qual o primeiro processo é a perda de um radical metila ($[M-CH_3]^+$) da metoxila sob energia de colisão alta, seguida da perda

de um grupo CO para o caso dos íons 285, **S-2** e 301, **S-1**, ou de uma segunda metila para o caso do íon 299, **S-3**.

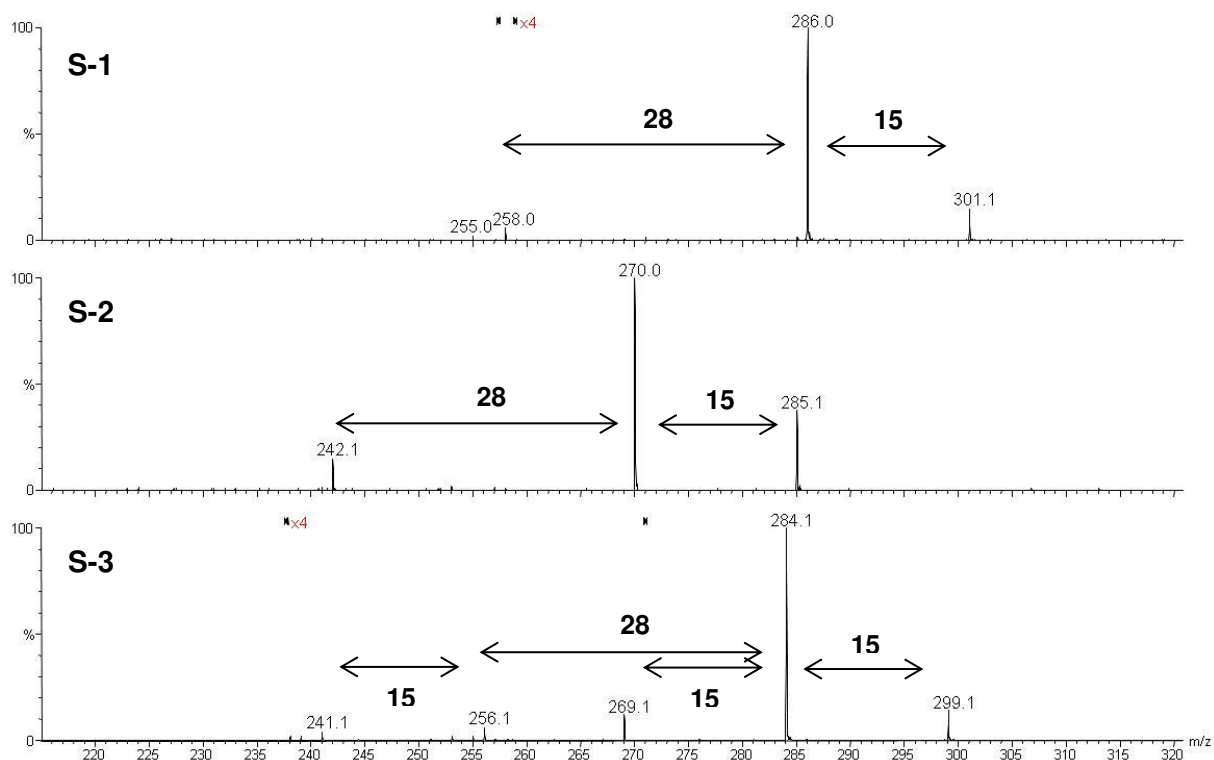


Figura 10. ESI(+)-MS/MS de **S-1**, m/z 301.1, **S-2**, m/z 285.1 e **S-3**, m/z 299.1.

Este tipo de fragmentação já havia sido observado em *O*-metil 3-desoxiantocianidinas e em *O*-metil antocianidinas por Melo et al.(2002) (**Figura 11**).

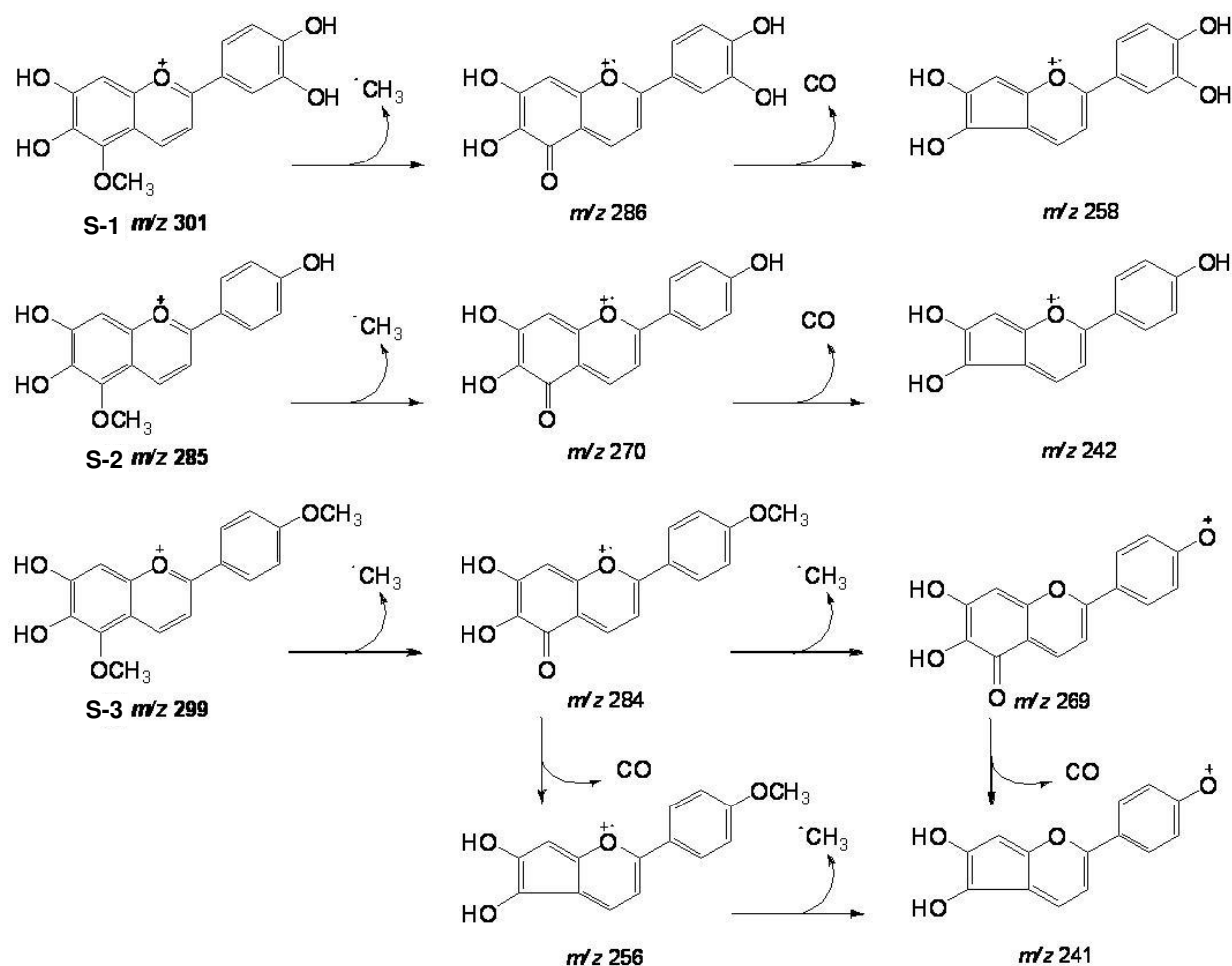


Figura 11. Proposta de fragmentação para S-1, S-2 e S-3.

Utilizando-se apenas uma sequência de extrações seguido de SPE obteve-se um extrato rico em 3-desoxiantocianidinas denominado de 3DAE. As pesquisas indicam que HPLC-DAD, ESI-MS, ESI-MS/MS e HPLC-MS/MS são ferramentas poderosas para identificar e caracterizar 3-desoxiantocianidinas requerendo simples preparação de amostras (**Tabela 1**). HPLC-MS/MS se mostrou bastante apropriada para ser usada no controle de qualidade de extratos contendo 3-desoxiantocianidinas usados em cosméticos ou outros produtos, já que um protocolo de MRM (*multiple reaction monitoring*) usando a transição $\text{M}^+ \rightarrow [\text{M}-\text{CH}_3]^+$ já levaria a um controle de qualidade confiável.

Tabela 1. Dados cromatográficos e espectrais de **S-1**, **S-2** e **S-3**.

	CCD (Rf) ^a		HPLC ^b -DAD	HPLC-MS/MS	UV-Vis	ESI-MS	
Composto	CHCl ₃ : acetona HCO ₂ H	HCl: HCO ₂ H: H ₂ O	t _R (min)/λ _{max} (nm)	t _R (min)	0,1 % HCl/ MeOH (λ _{max})	[M] ⁺ (m/z)	Fragmentos m/z
S-1	0,25	0,44	14,61 / 485	10,98	-	301,0697	286,1; 258,0
S-2	0,35	0,61	9,96 / 483	7,70	485	285,0799	270,0; 242,1
S-3	0,7	0,71	7,86 / 467	6,35	473	299,0876	284,1; 269,1; 256,1; 241,1

^a Fase estacionária: sílica gel;

^b Fase estacionária: C18; Fase móvel: metanol e água acidificada com H₃PO₄, pH 1,65.

II.1.2.4. Caracterização da **S-3** por HPLC-DAD, ESI-MS e ESI-MS/MS

HPLC/DAD

A extração utilizando água com o objetivo de se extrair açúcares foi otimizada já que se observou uma influência direta na pureza de **S-3**. Extração de duração de 1 hora sob agitação resultou em cromatogramas com % de área do pico **S-3** que variou entre 68 a 74%, para 24 horas de extração com água sob agitação, obteve-se % de área do pico **S-3** em torno de 88%, enquanto que para uma maceração por um período de 15 dias no escuro, obteve-se uma % de área para o pico **S-3** em torno de 93%. Após purificação, a área do pico **S-3** se tornou mais importante chegando a cerca de 98,8% com λ_{max-vis} 467 nm. Para comprovação da pureza do composto, outros comprimentos de onda foram avaliados e o pico com o mesmo tempo de retenção por encontrado.

ESI-MS e ESI-MS/MS

No espectro de ESI-MS a substância **S-3** foi detectada na sua forma catiônica e confirmado por medidas de m/z de alta precisão, 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio m/z 299,0876 [M]⁺ calculado para C₁₇H₁₅O₅⁺ 299,0839, E = 14 ppm).

Os experimentos de ESI(+)-MS/MS via CID revelaram um padrão de fragmentação característico para o íon da **S-3**, m/z 299. O cátion da **S-3** foi

primeiramente isolado e então fragmentado, a rota de fragmentação comum na qual o primeiro processo é a perda de um radical metila ($[M-CH_3]^{+\bullet}$) da metoxila sob energia de colisão alta, seguida de uma segunda metila (**Figura 12**).

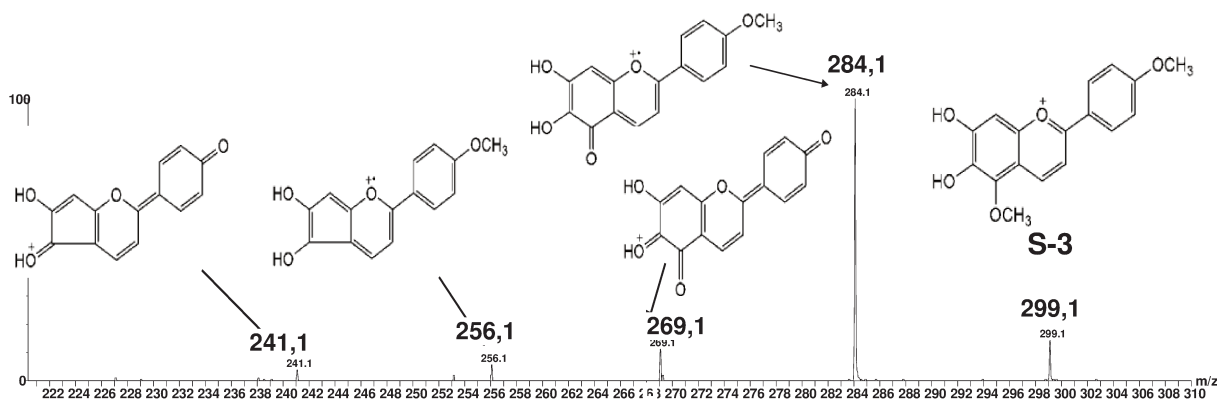


Figura 12. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da **S-3** (m/z 299).

Utilizando-se apenas uma sequência de extrações seguida de SPE obteve-se um extrato rico em 3-desoxiantocianidinas denominado de 3DAE. As técnicas de HPLC-DAD, ESI-MS, ESI-MS/MS e HPLC-MS/MS se mostraram eficazes para identificar e caracterizar as 3-desoxiantocianidinas requerendo simples preparação de amostras. HPLC-MS/MS se mostrou bastante apropriada para ser usada no controle de qualidade de extratos contendo 3-desoxiantocianidinas usados em cosméticos ou outros produtos, já que um protocolo de MRM (*multiple reaction monitoring*) usando a transição $M^+ \rightarrow [M-CH_3]^{+\bullet}$ já levaria a um controle de qualidade confiável.

II.2. Caracterização de extratos e folhas de 3 variedades de *A. chica* utilizando técnicas de espectrometria de massas e fluorescência de raios-X

Foram utilizadas nas análises folhas de três variedades da *A. chica* colhidas nas estações de chuva e seca em três diferentes períodos no decorrer do dia. O estudo destas amostras teve como objetivo investigar a variação da composição das folhas destas três variedades e assim avaliar se as 3-desoxiantocianidinas, compostos **S-1**, **S-2**, **S-3** e **S-4** encontradas somente nas folhas da *A. chica* podem ser usadas para diferenciar as variedades estudadas (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 1999).

II.2.1. Caracterização por ESI-MS – “Fingerprinting”

II.2.1.1. Material e Métodos

II.2.1.1.1 Planta e preparação de amostras

Três variedades de *A. chica* foram utilizadas neste estudo, conhecidas pela população da Amazônia como Variedade I (AC1), II (AC2) e III (AC3) (**Figura 13**). As variedades são continuamente cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental localizada na cidade de Manaus, AM, região central da Amazônia. Exsicatas foram depositadas por Dr. Francisco Célio Maia Chaves no Herbário do Instituto Federal do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste (IFAM-CMZL), na cidade de Manaus, AM. As exsicatas receberam as codificações: EAFM2900 (variedade I), EAFM2901 (variedade II) e EAFM2902 (variedade III). As espécimes foram identificadas pelo Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp como *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot.

As folhas foram secas na sombra e depois em estufa a 40 °C por 8 horas. Para preparação de extratos, as folhas foram moídas num moedor de plantas até a aparência de um pó fino e depois peneiradas, a fração entre 150 e 210 µm foi utilizada para os experimentos.

As folhas da *A. chica* das três variedades (AC1, AC2 e AC3) foram coletadas durante as estações de chuva (R) e seca (D), as duas principais estações da região da Amazônia correspondentes aos períodos de Dezembro-Maio e Junho-

Novembro respectivamente. Elas também foram coletadas em três períodos distintos do dia: manhã (M), meio dia (L) e fim de tarde (A) (**Tabela 2**).

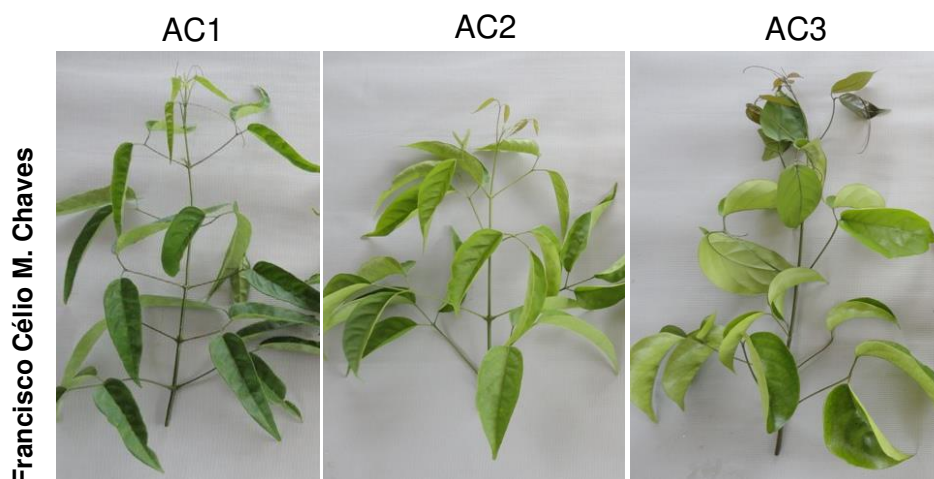


Figura 13. Folhas frescas da *A.chica*, variedades I (AC1), II (AC2) e III (AC3).

Tabela 2. Amostras das folhas analisadas em função da estação e período de coleta.

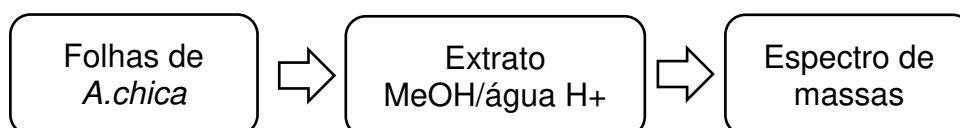
Variedade <i>A. chica</i>	Estação da coleta	Período da coleta	Codificação
I	Chuvosa	Manhã	AC1-R-M
		Meio dia	AC1-R-L
		Fim da tarde	AC1-R-A
	Seca	Manhã	AC1-D-M
		Meio dia	AC1-D-L
		Fim da tarde	AC1-D-A
II	Chuvosa	Manhã	AC2-R-M
		Meio dia	AC2-R-L
		Fim da tarde	AC2-R-A
	Seca	Manhã	AC2-D-M
		Meio dia	AC2-D-L
		Fim da tarde	AC2-D-A
III	Chuvosa	Manhã	AC3-R-M
		Meio dia	AC3-R-L
		Fim da tarde	AC3-R-A
	Seca	Manhã	AC3-D-M
		Meio dia	AC3-D-L
		Fim da tarde	AC3-D-A

II.2.1.1.2. Solventes utilizados

Foram utilizados os seguintes solventes nas extrações: metanol HPLC (Tedia, Fairfield, OH, USA), ácido fórmico HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha).

II.2.1.1.3. Obtenção dos extratos para caracterização por *fingerprinting*

Uma amostra de folhas trituradas de 100 mg foi extraída com 1 mL de solução de metanol / água acidificada com 7 % de ácido fórmico (1:1) dentro de microtubos de polipropileno tipo Eppendorf®. Cada tubo de amostra foi agitado num misturador Vortex por 1 min e centrifugado por mais 1 min. Uma alíquota de 5 µL do sobrenadante foi retirada de cada microtubo e diluída em 0,5 mL de solução Metanol / água acidificada com ácido fórmico (mesma utilizada anteriormente). Cada amostra diluída foi analisada por infusão direta no espectrômetro de massas. A extração e sequência de análise acima foram repetidas em triplicata para as 18 amostras da **Tabela 2**. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, o primeiro conjunto analisado recebeu o código “a” no final da modificação, o segundo “b” e o terceiro “c” como AC1-R-Ma, AC1-R-Mb e AC1-R-Mc.



Um espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) com interface de eletrospray, rodando no modo íon positivo foi usado para realizar as análises de ESI-MS e ESI-MS/MS. A unidade de íons operou numa temperatura de desolvatação de 80 °C, voltagem de capilar de 2,1 kV e voltagem de cone de 40 eV. As amostras foram inseridas diretamente na fonte de íons numa taxa de 200 nLmin⁻¹ usando um injetor (Triversa NanoMate, Advion BioSciences, Norfolk, UK). Os espectros foram adquiridos no intervalo de 150 a 1000 *m/z* e acumulados por 60 s. Os espectros ESI-MS/MS foram obtidos para os íons de 3-desoxiantocianidinas usando energia de colisão variando de 15 a 35 eV. A pressão do gás de colisão (Ar) foi otimizada para produzir fragmentação dos íons sob investigação.

Os dados de ESI-MS foram analisados usando o método de PLS-DA (PLS-Toolbox 4.02, Eigenvector Technologies, Manson, WA, USA). Os íons com intensidade abaixo de 20 % relativos ao íon abundante foram desprezados durante o tratamento de dados. Todos os cálculos e gráficos foram gerados usando a plataforma do MatLab 6.5 (MathWorks, Natick, MA, USA).

II.2.1.2. Resultados e discussão da caracterização por *fingerprinting*

As substâncias **S-1**, **S-2**, **S-3** e **S-4** referentes aos sinais m/z 285, 299, 301 e 315 das folhas da *A. chica* foram observados nos espectros ESI no modo positivo das variedades I, II e III, exemplos representativos estão na **Figura 14**. A **Tabela 3** mostra a variação dos sinais para todas as amostras da **Tabela 2** analisadas.

Analisando os espectros de massas de cada uma das variedades da *A. chica* isoladamente, pouca diferença foi percebida entre eles quando as folhas foram coletadas em épocas diferentes ou em horários diferentes do dia. Embora todas as variedades mostraram conter os íons moleculares m/z 285, 299 e 301, estes íons apresentaram baixa intensidade em alguns espectros. Por exemplo, os espectros de massa dos extratos das folhas da variedade I exibem o íon m/z 299 como íon base em 50 % dos doze espectros desta variedade e o íon m/z 463 como o íon base no restante dos demais espectros desta mesma variedade, **Tabela 4**. Os espectros da variedade II sempre exibiram como íon base o íon m/z 299, **Tabela 5** e finalmente os espectros da variedade III exibiram três tipos de íons base, m/z 301 (em 58 % dos espectros), 160 (em 34 % dos espectros) e 287 (em 8 % dos espectros), **Tabela 6**. Considerando que os íons com menos de 20 % de intensidade em relação ao íon de maior abundância foram desprezados, os espectros de massa das três variedades diferem nas intensidades relativas dos três íons moleculares referentes às **S-1**, **S-2** e **S-3**. O íon molecular correspondente ao m/z 315 (correspondente à **S-4**) foi encontrado nos espectros dos extratos das folhas da variedade III, independente da época do ano ou do período do dia em que as folhas desta variedade foram coletadas. O íon m/z 315 foi também identificado em alguns dos espectros das variedades I e II, no entanto, apresentando intensidade bastante baixa.

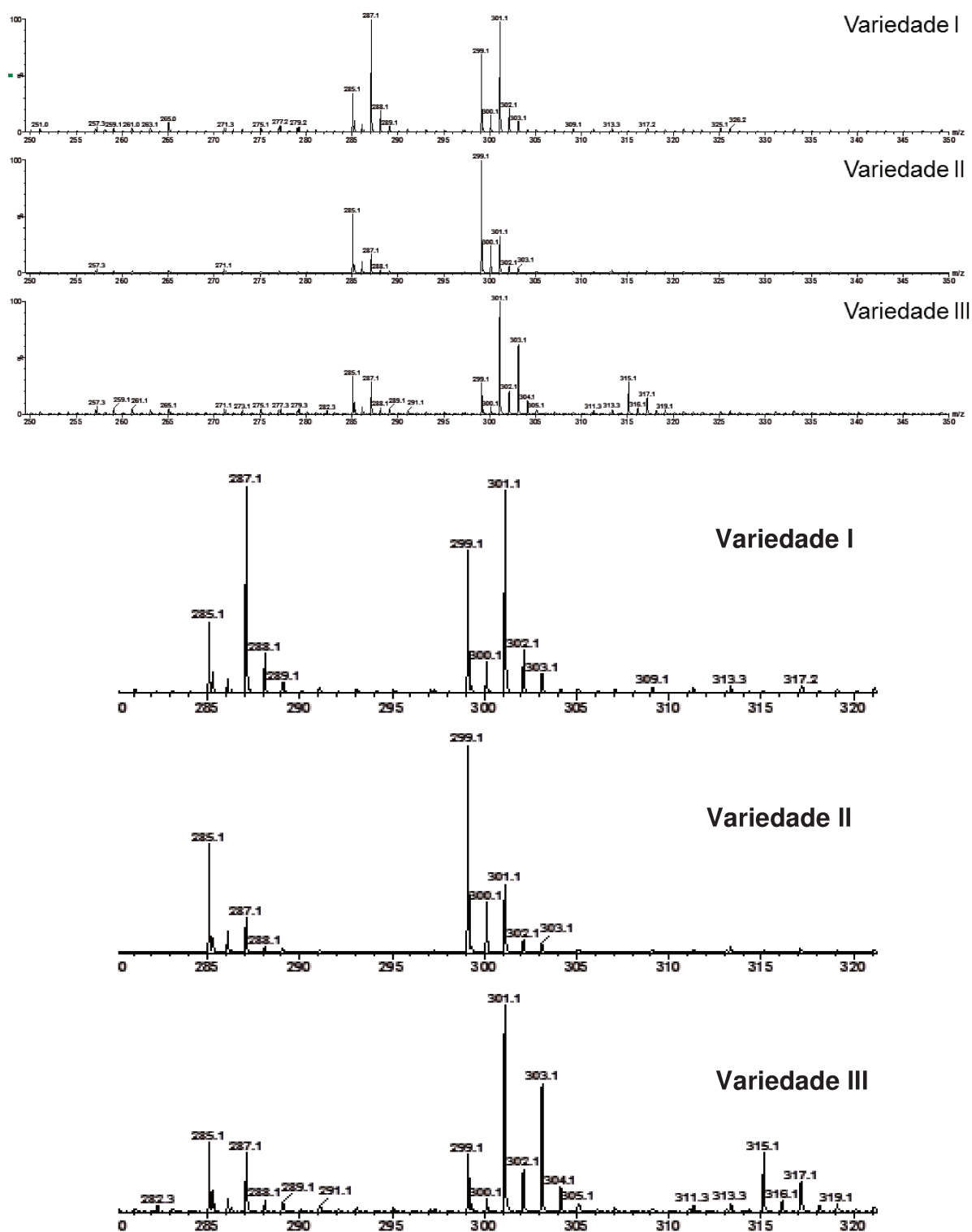


Figura 14. Espectros de massa representativos de ESI(+) das variedades I, II e III da *A. chica*.

Tabela 3. Sinais de intensidade de espectros de massas para os extratos das folhas de *A. chica* coletadas em diferentes horários do dia e diferentes épocas do ano.

<i>m/z</i>	Intensidade Relativa do Sinal do Espectro de Massa								
	Variedade I			Variedade II			Variedade III		
	Range	Média	SD	Range	Média	SD	Range	Média	SD
158.1	0.0-12.8	4.6	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
160.1	0.0-13.2	9.3	4.6	0.0-12.6	8.9	3.3	10.3-18.7	13.7	2.2
164.1	0.0	0.0	0.0	0.0-6.4	1.5	2.7	8.1-16.6	11.2	2.2
203.1	0.0-6.0	0.5	1.7	0.0-7.3	2.5	2.5	0.0-6.7	2.8	2.6
243.1	0.0-3.6	0.3	1.0	0.0-5.0	1.1	1.7	0.0-4.9	0.9	1.6
271.1	0.0-5.6	1.5	2.2	0.0-4.5	1.4	1.6	0.0-4.1	0.8	1.6
285.1	0.0-24.3	11.1	9.0	12.6-20.2	15.6	2.3	0.0-8.6	5.8	2.1
287.1	0.0-15.2	9.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0-20.5	6.0	6.0
299.1	4.8-38.6	17.7	12.0	31.4-40.5	35.2	2.6	0.0-11.0	3.2	4.2
301.1	0.0-14.4	6.6	6.9	0.0	0.0	0.0	0.0-21.7	15.0	6.1
303.1	0.0-3.1	0.8	1.2	0.0-2.8	1.9	0.9	0.0-11.1	2.9	4.5
315.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0-7.7	5.0	2.0
317.1	0.0-2.7	0.8	1.2	0.0-2.2	1.1	0.9	0.0-3.6	0.6	1.4
357.2	1.6-9.3	5.7	2.8	0.0-3.8	2.5	1.2	0.0	0.0	0.0
357.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0-4.4	2.7	1.4
365.1	0.0	0.0	0.0	0.0-1.0	0.2	0.4	0.0-2.0	1.1	0.8
447.1	0.0-1.9	0.6	0.8	0.0-1.5	1.0	0.5	0.0-0.9	0.1	0.3
463.1	2.0-18.8	10.7	6.3	1.0-12.5	7.9	3.4	1.1-9.2	6.7	2.8
477.2	1.0-10.9	6.1	3.8	0.7-7.4	4.3	1.9	0.0-2.8	2.0	0.8
479.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0-9.9	6.6	3.3
533.2	0.0-3.0	1.0	1.4	0.0-1.5	0.9	0.5	0.0-1.4	0.9	0.4
585.2	0.0-1.8	0.6	0.7	1-5.5	2.7	1.4	0.0-0.5	0.1	0.2
593.3	1.6-3.1	2.2	0.5	0.9-5.6	2.6	1.2	0.0-3.6	1.5	1.4
593.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0-3.4	1.1	1.4
599.2	0.0-1.0	0.2	0.4	0.8-3.6	2.1	1.0	0.0-0.8	0.2	0.3

Nota 1: Média e SD = Média e desvio padrão das intensidades dos sinais dos espectros de massa, respectivamente.

Nota 2: Dados de intensidade relativa são representativos de cada variedade de *A. chica* independente da época do ano e da hora do dia que as folhas foram coletadas.

Nota 3: Os dados da tabela foram gerados a partir das **Tabela 4**, **Tabela 5**, **Tabela 6** excluindo os íons com intensidade inferior a 20 % da intensidade do pico base. As intensidades dos demais picos foram normalizados e os íons de intensidade relativa menor que 1 % foram também eliminados, com exceção dos íons correspondentes às substâncias já isoladas da *A. chica* (*m/z*: 285, 299, 301 e 315, em negrito).

As análises dos espectros de massa das três variedades da *A. chica* revelaram que 101 sinais de íons permaneceram após a eliminação dos picos 20 % menos intensos (**Tabela 4**, **Tabela 5**, **Tabela 6**). Posteriormente, para efeito de ilustração foram eliminados os sinais com intensidade inferior a 1 % (**Tabela 3**). Através da observação destes picos mais intensos, tem-se que a variedade I ainda apresenta, mesmo após a eliminação de picos menos intensos, os íons de 3-desoxiantocianidinas *m/z* 285, 299, 301; a variedade II apresenta os íons *m/z* 285 e 299 e a variedade III os íons *m/z* 285, 299, 301 e 315.

Após a eliminação inicial dos sinais 20 % menos intensos, os 101 sinais remanescentes e suas intensidades relativas foram submetidos à análise de PLS-DA. O modelo PLS-DA foi utilizado com o objetivo de avaliar se os dados de espectro de massas poderiam diferenciar as três variedades de *A. chica*, separando os dados em 3 classes distintas. O número de variáveis latentes usadas no modelo foi escolhido utilizando-se validação cruzada ou *cross validation - leave one out*, que consiste em separar uma amostra de cada vez para construção do modelo com as restantes das amostras e estima-se o erro da previsão. Este processo é repetido para todas as amostras, incluindo-se as análises dos espectros de massas realizadas em triplicata. No início consideraram-se todas as amostras, no entanto, nenhum modelo parecia gerar alguma separação até que encontrou-se que um dos conjuntos das análises em triplicatas divergiam dos restantes dos resultados, então foram eliminados um conjunto de análises para finalizar o modelo. Assim tomaram-se os sinais das amostras de 1-12 correspondentes a variedade I, os sinais das amostras de 13 a 24 para a variedade II e os sinais das amostras de 25 a 36 para a variedade III. Vinte e sete amostras foram selecionadas para calibração e três amostras de cada variedade foram utilizadas para validação, são elas: amostras 3, 6 e 7 da variedade I; 13, 20 e 22 da variedade II e 26, 29 e 33 da variedade III. O algoritmo foi aplicado utilizando-se seis variáveis latentes e o conjunto de dados foi centrado na média. Três gráficos foram gerados (**Figura 15**), um para cada classe de dados, correspondentes às variedades de *A. chica*. Nos gráficos as amostras que caíram acima da linha tracejada (Discrim Y) significa que pertenciam a uma dada classe, enquanto que as amostras que caíram abaixo da linha pontilhada significa que não pertenciam àquela dada classe. Todas as amostras utilizadas na calibração dos dados e na validação dos mesmos foram corretamente classificadas em variedades I, II e III, como pode ser visto na **Figura 15**. Na **Figura 15A**, as amostras da variedade I se concentraram nos valores de Y próximas a 1 enquanto que as amostras da variedade II e III se concentraram na linha de Y próximo a 0. Mesma coisa para as **Figura 15B** e **15C**.

Tabela 4. Dados de 101 íons m/z e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade I. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a **Figura 15**. Gráficos gerados utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir de ESI(+)-MS de extratos de 3 variedades de *A. chica*. A, B e C são os gráficos para amostras das variedades I, II e III respectivamente

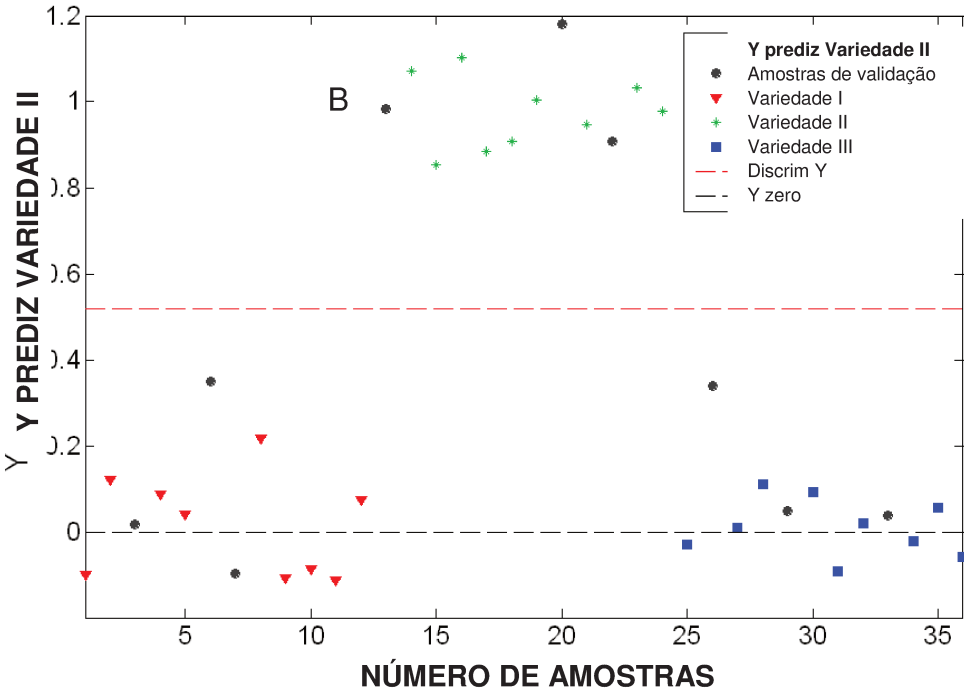
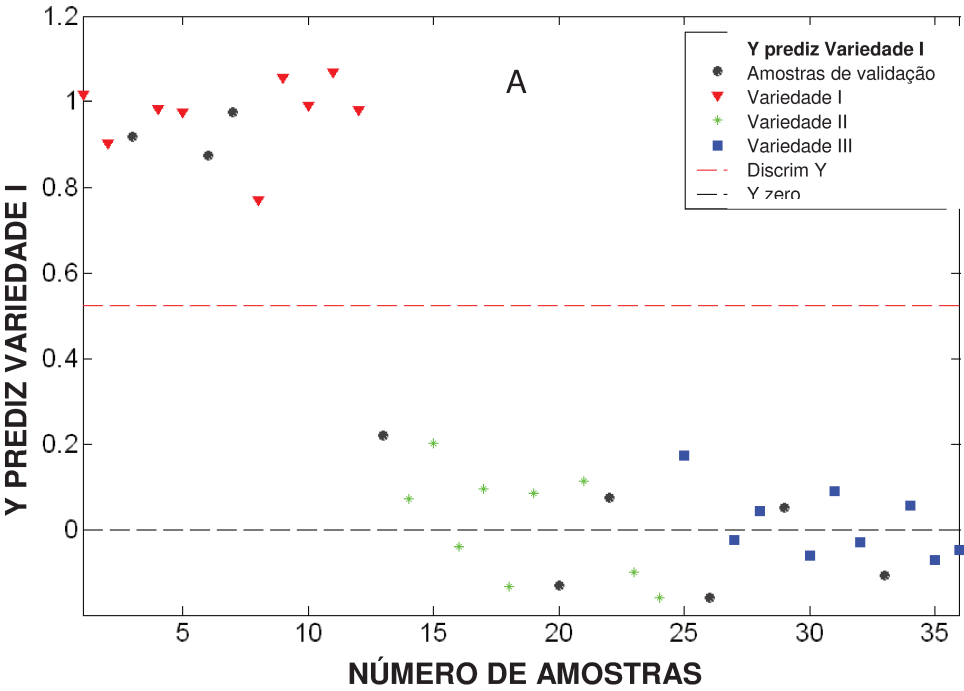
m/z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Range(min max)	Media	SD	
	AC1_R_Ma	AC1_R_La	AC1_R_Aa	AC1_D_Ma	AC1_D_La	AC1_D_Aa	AC1_R_Mb	AC1_R_Lb	AC1_R_Ab	AC1_D_Mb	AC1_D_Lb	AC1_D_Ab				
158,1	0,0	0,0	0,0	8,2	0,0	12,8	0,0	0,0	7,3	6,9	8,5	12,0	0,0	12,8	4,6	5,1
160,1	10,3	11,4	11,0	9,8	0,0	0,0	12,4	13,2	12,8	9,1	9,3	12,5	0,0	13,2	9,3	4,6
203,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,5	1,7
243,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	3,6	0,3	1,0
261,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	2,6	0,2	0,8
271,1	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	3,7	0,0	5,6	1,5	2,2
285,1	0,0	9,8	4,8	24,3	3,7	23,3	3,2	10,7	4,9	21,8	6,0	21,2	0,0	24,3	11,1	9,0
287,1	14,2	14,4	12,6	0,0	15,2	0,0	13,3	13,7	11,6	0,0	12,4	0,0	0,0	15,2	9,0	6,7
299,1	4,8	17,5	9,9	32,0	6,7	38,6	5,5	18,4	9,8	27,9	9,2	32,5	4,8	38,6	17,7	12,0
301,1	14,4	0,0	13,6	0,0	13,8	0,0	13,5	0,0	11,7	0,0	11,7	0,0	0,0	14,4	6,6	6,9
303,1	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	3,1	0,8	1,2
317,1	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	2,4	0,0	2,7	0,8	1,2
333,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	1,5	0,1	0,4
357,2	8,0	7,2	7,6	2,6	8,0	2,1	9,3	7,2	6,7	1,9	5,9	1,6	1,6	9,3	5,7	2,8
381,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	1,5	0,0	1,2	0,0	1,5	1,5	0,0	1,5	0,6	0,7
427,1	1,8	0,0	0,0	0,0	1,4	1,2	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,5	0,7
427,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,9	0,1	0,3
442,3	0,0	0,0	1,2	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	2,2	0,0	0,0	2,6	0,6	1,0
447,1	1,9	1,8	1,5	0,0	0,0	0,0	1,1	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,6	0,8
455,4	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
463,1	16,6	14,4	15,6	3,1	18,8	2,5	14,8	11,8	13,1	2,8	13,0	2,0	2,0	18,8	10,7	6,3
473,4	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
477,2	10,9	7,8	8,6	1,6	10,4	1,5	9,4	7,1	7,3	1,1	6,6	1,0	1,0	10,9	6,1	3,8
485,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,1	0,3
501,1	1,0	1,0	1,0	0,0	1,2	0,0	0,9	0,9	0,8	0,0	0,8	0,0	0,0	1,2	0,6	0,5
517,2	1,2	1,2	1,1	0,0	1,4	0,0	1,1	1,0	1,2	0,0	1,4	0,0	0,0	1,4	0,8	0,6
519,1	0,0	2,0	2,2	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	2,4	0,7	1,0
519,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	2,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,5	1,0
531,2	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,9	0,0	0,0	1,0	0,2	0,4
533,1	3,0	2,2	2,5	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,9	1,4
533,2	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	3,0	2,7	2,8	0,0	3,0	0,0	0,0	3,0	1,0	1,4
547,2	2,5	0,0	0,8	0,0	1,5	0,0	1,1	1,0	1,5	0,0	1,6	0,0	0,0	2,5	0,8	0,8
549,2	0,0	0,8	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
563,2	1,3	0,8	1,0	0,0	1,3	0,0	1,1	0,8	0,7	0,0	0,8	0,0	0,0	1,3	0,7	0,5
565,1	0,0	0,0	1,1	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,2	0,5
565,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,1	0,4
571,2	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,9	0,0	0,8	0,0	1,0	0,0	0,7	0,0	1,4	0,4	0,5
577,2	1,1	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,2	0,4
579,2	2,7	0,9	1,2	0,0	2,0	0,0	1,5	0,7	0,8	0,0	0,9	0,0	0,0	2,7	0,9	0,9
583,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,6	0,1	0,2
585,2	0,0	0,9	0,0	1,8	0,0	1,1	0,0	1,0	0,0	1,3	0,0	0,9	0,0	1,8	0,6	0,7
593,3	2,1	1,7	1,7	2,8	3,1	1,6	2,0	2,4	2,0	2,0	2,6	1,9	1,6	3,1	2,2	0,5
599,2	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	1,0	0,2	0,4
599,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,3
603,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	1,2	0,2	0,4
607,2	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,2
609,3	0,0	0,0	0,0	0,8	0,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,9	0,3	0,3
617,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,8	0,1	0,3
617,3	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,2
637,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,2
643,3	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,2
645,3	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1	0,2
657,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,2
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
Maior Intensidade	16,6	17,5	15,6	32,0	18,8	38,6	14,8	18,4	13,1	27,9	13,0	32,5				
ion	463	299	463	299	463	299	463	299	463	299	463	299				

Tabela 5. Dados de 101 íons m/z e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade II. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a **Figura 15B**.

m/z	13 AC2_R_Ma	14 AC2_R_La	15 AC2_R_Aa	16 AC2_D_Ma	17 AC2_D_La	18 AC2_D_Aa	19 AC2_R_Mb	20 AC2_R_Lb	21 AC2_R_Ab	22 AC2_D_Mb	23 AC2_D_Lb	24 AC2_D_Ab	Range(min/max) Média SD			
160,1	8,2	8,1	8,6	7,9	0,0	10,3	10,7	12,1	10,9	6,8	10,9	12,6	0,0	12,6	8,9	3,3
164,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4	6,3	0,0	6,4	1,5	2,7
203,1	0,0	0,0	3,8	0,0	7,3	4,1	0,0	4,5	3,4	4,2	0,0	2,9	0,0	7,3	2,5	2,5
229,1	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,4	1,2
243,1	0,0	2,8	0,0	0,0	5,0	2,5	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	5,0	1,1	1,7
261,1	0,0	3,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,4	1,0
271,1	0,0	2,3	2,5	0,0	4,5	3,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	1,9	0,0	4,5	1,4	1,6
277,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
280,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	1,7	0,1	0,5
285,1	14,7	12,6	18,2	16,4	13,0	16,0	16,7	13,1	20,2	16,4	13,7	16,6	12,6	20,2	15,6	2,3
299,1	35,3	40,5	36,2	33,2	31,4	35,1	34,0	37,5	36,5	32,7	32,6	37,8	31,4	40,5	35,2	2,6
303,1	0,0	1,8	2,5	1,9	2,8	2,0	2,7	2,3	2,4	2,3	2,2	0,0	0,0	2,8	1,9	0,9
317,1	1,7	1,8	1,6	0,0	0,0	2,0	0,0	1,8	1,5	0,0	0,0	2,2	0,0	2,2	1,1	0,9
321,1	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,1	0,5
322,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	3,1	0,5	1,1
333,1	0,0	0,0	1,3	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,3	0,6
340,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	1,5	0,2	0,6
357,2	3,8	2,7	3,2	2,7	2,4	0,0	3,0	2,8	3,2	2,6	3,2	0,0	0,0	3,8	2,5	1,2
365,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,2	0,4
373,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	1,1	0,1	0,3
381,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	1,5	0,2	0,6
442,3	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,2	0,4
447,1	1,5	1,2	1,5	1,4	1,2	0,0	1,3	1,0	1,3	1,1	1,0	0,0	0,0	1,5	1,0	0,5
461,2	0,9	0,0	0,7	1,1	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,9	0,8	0,0	0,0	1,1	0,4	0,5
463,1	12,5	8,3	9,0	9,5	9,3	1,7	10,4	7,7	8,4	7,6	9,9	1,0	1,0	12,5	7,9	3,4
477,2	7,4	4,7	4,3	5,0	4,7	0,9	6,2	4,7	4,2	4,2	5,2	0,7	0,7	7,4	4,3	1,9
485,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,2
485,9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,2	0,5
495,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
501,1	0,9	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,7	0,0	0,6	0,0	0,7	0,0	0,0	0,9	0,3	0,4
517,2	1,0	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0	0,7	0,8	0,6	0,0	0,8	0,0	0,0	1,0	0,4	0,4
519,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
531,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,3
533,2	1,4	1,1	0,6	0,9	1,0	0,0	1,4	1,5	0,9	0,8	1,4	0,0	0,0	1,5	0,9	0,5
547,2	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,0	1,1	1,2	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	1,2	0,4	0,5
571,2	0,9	0,6	0,5	1,9	1,0	0,9	1,0	0,6	0,5	1,9	1,2	0,8	0,5	1,9	1,0	0,5
579,2	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	0,2
583,2	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,0	0,4	0,0	0,5	0,2	0,2
585,2	2,6	1,4	1,0	5,5	2,4	3,1	2,6	1,8	1,2	5,1	3,0	2,9	1,0	5,5	2,7	1,4
593,3	2,2	2,5	0,9	5,6	3,3	2,3	2,7	2,9	1,8	2,6	3,3	1,6	0,9	5,6	2,6	1,2
599,2	1,9	1,2	0,8	3,6	1,6	3,3	1,8	1,5	0,9	3,4	2,0	3,1	0,8	3,6	2,1	1,0
609,3	0,7	0,7	0,0	0,8	0,0	0,0	0,7	0,9	0,4	0,5	0,5	0,3	0,0	0,9	0,5	0,3
709,2	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1
869,3	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1
Maior Intensidade	35,3	40,5	36,2	33,2	31,4	35,1	34,0	37,5	36,5	32,7	32,6	37,8				
ion	299	299	299	299	299	299	299	299	299	299	299	299				

Tabela 6. Dados de 101 íons m/z e intensidade relativa de sinais provenientes de MS da variedade III. Os sinais menores que 20 % em relação ao pico base foram excluídos. Os dados foram utilizados na análise de PLS-DA que originou a **Figura 15C**.

m/z	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	Range(min/max) Média SD			
	AC3_R_Ma	AC3_R_La	AC3_R_Aa	AC3_D_Ma	AC3_D_La	AC3_D_Aa	AC3_R_Mb	AC3_R_Lb	AC3_R_Ab	AC3_D_Mb	AC3_D_Lb	AC3_D_Ab				
160,1	10,3	14,2	12,5	12,1	14,4	15,0	12,0	16,1	13,4	12,7	13,4	18,7	10,3	18,7	13,7	2,2
164,1	9,4	11,1	10,4	8,1	10,7	13,2	11,1	13,0	11,5	9,3	10,2	16,6	8,1	16,6	11,2	2,2
203,1	6,7	4,7	0,0	4,5	0,0	0,0	4,8	4,3	0,0	4,1	4,6	0,0	0,0	6,7	2,8	2,6
231,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,3	0,9
243,1	4,9	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	4,9	0,9	1,6
261,1	3,1	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	3,1	0,9	1,4
271,1	4,1	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	4,1	0,8	1,6
279,3	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	1,9	0,3	0,7
285,1	5,8	6,0	0,0	7,3	6,7	6,0	8,6	5,9	4,0	7,2	6,2	6,0	0,0	8,6	5,8	2,1
287,1	0,0	0,0	5,2	9,6	0,0	0,0	20,5	9,0	5,5	10,6	5,8	5,3	0,0	20,5	6,0	6,0
299,1	8,5	11,0	0,0	8,0	5,2	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,0	3,2	4,2
301,1	14,8	14,8	8,9	21,2	19,3	18,1	0,0	16,0	10,4	21,7	16,6	17,8	0,0	21,7	15,0	6,1
303,1	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	1,9	8,3	0,0	10,8	0,0	2,2	0,0	0,0	11,1	2,9	4,5
315,1	4,3	4,8	0,0	7,5	5,4	6,0	4,3	5,0	3,4	7,7	4,9	6,4	0,0	7,7	5,0	2,0
317,1	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,6	1,4
321,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	1,3	0,1	0,4
331,1	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	1,7	0,3	0,6
333,1	2,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,3	0,7
341,4	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	0,3	1,0
351,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	1,2	0,1	0,3
357,3	3,0	2,6	4,4	0,0	3,3	2,9	3,4	2,6	4,4	0,0	3,0	2,8	0,0	4,4	2,7	1,4
365,1	0,0	1,6	0,0	0,0	1,5	1,4	1,5	1,9	2,0	0,0	1,9	1,5	0,0	2,0	1,1	0,8
369,4	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,4	1,5
381,1	0,0	1,4	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	1,5	1,4	0,0	1,8	1,5	0,0	1,8	0,8	0,8
427,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,1	0,3
431,4	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,2	0,6
447,1	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,3
459,5	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,2	0,8
463,1	7,2	8,6	9,0	1,2	9,2	8,4	7,0	7,7	7,6	1,1	7,9	6,1	1,1	9,2	6,7	2,8
477,2	2,2	2,6	2,5	0,0	2,8	2,7	2,0	2,3	2,0	0,7	2,3	2,0	0,0	2,8	2,0	0,8
479,2	7,0	7,3	9,9	0,0	9,7	8,1	6,9	6,8	8,6	0,0	8,1	6,8	0,0	9,9	6,6	3,3
485,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,6	0,9	0,0	0,0	0,9	0,2	0,4
485,9	1,4	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,2	0,5
493,2	1,2	1,4	1,7	0,0	1,5	1,3	1,1	1,2	1,4	0,0	1,2	1,0	0,0	1,7	1,1	0,5
501,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,1	0,2
517,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,7	0,1	0,2
519,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,9	0,0	0,0	0,7	0,0	0,9	0,2	0,4
533,2	1,0	0,9	1,4	0,0	1,3	1,0	0,9	0,8	1,2	0,0	1,2	0,9	0,0	1,4	0,9	0,4
549,2	1,0	0,8	1,6	0,0	1,6	1,0	0,8	0,7	0,9	0,0	1,4	1,1	0,0	1,6	0,9	0,5
579,2	0,0	0,0	0,8	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,1	0,3
585,2	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,2
593,3	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	1,8	3,6	3,1	2,1	0,0	3,6	1,5	1,4
593,4	2,1	2,9	0,0	3,4	2,7	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	1,1	1,4
599,2	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,7	0,5	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,8	0,2	0,3
609,3	0,0	1,1	0,9	1,2	0,8	0,9	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,9	0,0	1,2	0,6	0,5
637,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1
Maior Intensidade	14,8	14,8	12,5	21,2	19,3	18,1	20,5	16,1	13,4	21,7	16,6	18,7				
ion	301,0	301,0	160,0	301,0	301,0	301,0	287,0	160,0	160,0	301,0	301,0	160,0				



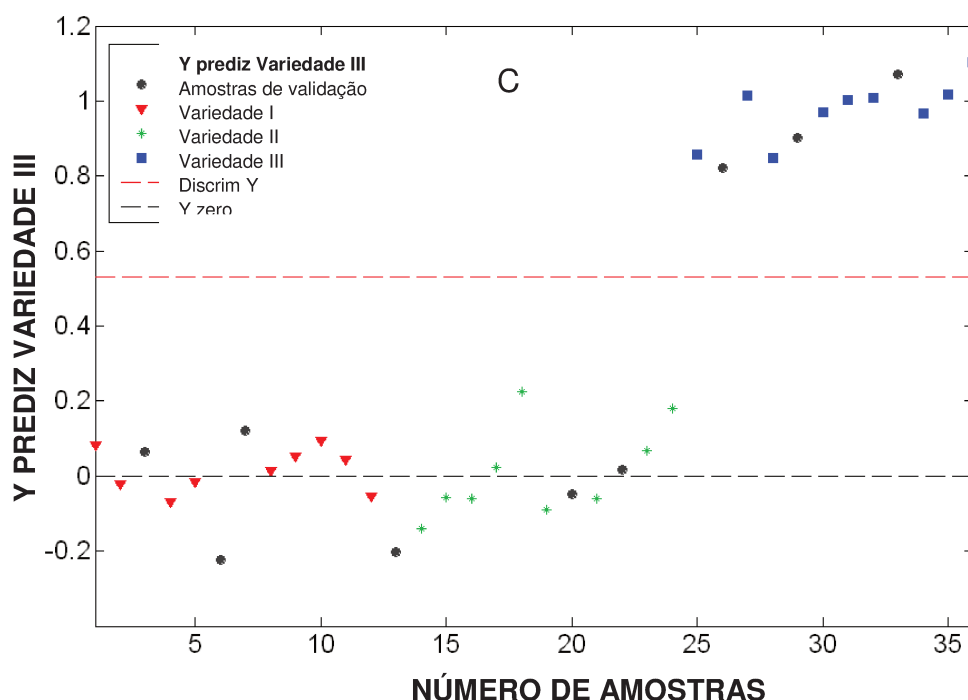


Figura 15. Gráficos gerados utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir de ESI(+)-MS de extratos de 3 variedades de *A. chica*. A, B e C são os gráficos para amostras das variedades I, II e III respectivamente.

De acordo com as análises de PLS-DA, dentro de uma variedade de *A. chica* não há diferenças qualitativas significativas entre os perfis de 3-desoxiantocianidinas, considerando-se os extratos de amostras colhidas em épocas diferentes e em horários do dia distintos. Isto é uma indicação de que o aspecto variedade é o mais importante dentre os que definem os perfis de 3-desoxiantocianidinas das folhas de *A. chica*. Podemos concluir que dados de ESI-MS de extratos de folhas de *A. chica* tratadas com modelo PLS-DA mostram ser uma técnica efetiva capaz de classificar as três variedades de *A. chica*. Também se pode concluir que efeitos sazonais e temporais não afetam os resultados.

II.2.2. Caracterização por Fluorescência de Raios-X (FRX)

Com a intenção de diferenciar as variedades de *A. chica* utilizando FRX, foram analisadas as diferentes amostras de folhas colhidas em locais, períodos do ano e dos dias distintos. Os espectros adquiridos foram tratados quimiometricamente utilizando PCA.

II.2.2.1. Material e Métodos

II.2.2.1.1. Planta e preparação de amostras

Três variedades de *A. chica* foram utilizadas neste estudo, conhecidas pela população da Amazônia como variedades I, II e III (**Figura 13**). Além das amostras cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental localizada na cidade de Manaus, AM, região central da Amazônia, utilizadas na caracterização por ESI-MS, também foram avaliadas outras amostras da própria região da Amazônia, da região de São Paulo, Pará e Paraná.

As amostras de *A. chica* foram preparadas conforme descrito no item **II.2.1.1.1**. As folhas e uma amostra dos galhos foram moídas num moedor de plantas até a aparência de um pó fino e depois peneiradas, a fração entre 150 e 210 µm foi utilizada para os experimentos. As amostras foram novamente secas em estufas a 40°C por 16 horas para garantir a eliminação de umidade remanescente. As amostras foram conservadas num dessecador segundo normas do SRM (Standard Reference Material, National Institute of Standards & Technology). Para as análises por FRX, 200 mg de cada amostra foram adicionadas em celas de teflon com diâmetro de 3 cm aproximadamente, cuja base era preparada com um filme de Mylar® (polietileno) esticado. Durante as análises, as celas foram irradiadas em duplicata.

Cinco amostras certificadas foram utilizadas como referência padrão provenientes do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia NIST-SRM (do inglês, *National Institute of Standards & Technology - Standard Reference Material*) e do Wepal (*Wageningen Evaluating Programs for Analytical Laboratories*), são elas: maçã (SEM 1515), pêssego (SEM 1547), palmeira (WEPAL 652), alfafa (WEPAL 124) e cravo (WEPAL 883). Os padrões foram importantes para o cálculo de Ferro e outros elementos contidos nas amostras.

As folhas da *A. chica* das três variedades (identificadas pela espessura da folha) foram coletadas em duas épocas do ano, denominadas na região norte, de estações de chuva (R) e seca (D), correspondentes aos períodos de Dezembro-Maio e Junho-Novembro, respectivamente. Algumas amostras também foram coletadas em três períodos distintos do dia: manhã (M), meio dia (L) e fim de tarde (A), num total de 32 amostras (**Tabela 7**).

Tabela 7. Amostras analisadas utilizando fluorescência de raio-X.

Estado	Origem	Variedade	Estação da Coleta	Hora Coleta	Ano	Codificação
Amazonas	Embrapa Ocidental	I	Chuvosa	Manhã	2007	AM1-R-M
				Meio dia		AM1-R-L
				Fim da tarde		AM1-R-A
			Seca	Manhã		AM1-D-M
				Meio dia		AM1-D-L
				Fim da tarde		AM1-D-A
		II	Chuvosa	Manhã		AM2-R-M
				Meio dia		AM2-R-L
				Fim da tarde		AM2-R-A
			Seca	Manhã		AM2-D-M
				Meio dia		AM2-D-L
				Fim da tarde		AM2-D-A
		III	Chuvosa	Manhã		AM3-R-M
				Meio dia		AM3-R-L
				Fim da tarde		AM3-R-A
			Seca	Manhã		AM3-D-M
				Meio dia		AM3-D-L
				Fim da tarde		AM3-D-A
	Sitio Way	I	Chuvosa	Ano 1	2007	AM1-R1
				Ano 2	2006	AM1-R2
			Seca	Ano 2		AM1-D2
		II	Chuvosa	Ano 1	2007	AM2-R1
			Seca	Ano 2	2006	AM2-D2
Pará	Cultivo Particular	III	Chuvosa	Ano 1	2007	PA3-R1
			Seca	Ano 1	2007	PA3-D1
				Ano 2	2006	PA3-D2
São Paulo	Cultivo Particular	I	Chuvosa	Ano 1	2007	SP1-R
			Seca	Ano 1		SP1-D
Paraná	Cultivo Particular	I	Chuvosa	Ano 1	2007	PR1-C1
			Seca	Ano 1	2007	PR1-S1
				Ano 2	2006	PR1-S2
Paraná Galhos	Cultivo Particular		Chuvosa	Ano1	2007	PRG1-C1

II.2.2.1.2. Caracterização das amostras por fluorescência de raios-X

A utilização da FRX aliada à quimiometria pode mostrar informações importantes acerca de amostras orgânicas a partir de pequenas variações na posição da banda de espalhamento Raman de raios-X, conforme discutido na

introdução. Neste item são discutidos os resultados da aplicação da técnica focando na região de espalhamento para avaliar as semelhanças entre as variedades estudadas através da formação de grupos.

O equipamento de fluorescência de raios-X por dispersão de energia utilizado foi da marca Shimadzu (modelo EDX 700) com tubo de raios-X de Ródio (Rh) e detector semicondutor de Si (Li). A voltagem utilizada foi de 50 kV e a corrente aplicada no tubo de raios-X de 100 μ A. A faixa de energia foi de 0 a 42 keV com resolução de 0,02 keV. Os experimentos foram realizados no laboratório de coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-Unicamp).

Após a radiação das folhas e de uma amostra de galhos, os espectros foram adquiridos e tratados quimiometricamente utilizando PCA.

Os espectros obtidos através da análise por fluorescência de raios-X possuem duas regiões de interesse para análise: uma que se refere à região onde ocorre o efeito fotoelétrico, revelando, por exemplo, as linhas $K\alpha$ e $K\beta$ referente a cada metal, e a outra região referente ao espalhamento da amostra, onde ocorre o espalhamento Raman de raios-X, no caso em questão, ao redor de 19-22 keV, onde se manifestam os picos $K\alpha$ e $K\beta$ dos espalhamentos Compton e Rayleigh.

Os resultados de PCA dos espectros mostram que utilizando todas as 32 amostras de folhas e galho, descritos na **Tabela 7**, o espalhamento apresenta informações nas componentes principais 1 e 2.

O PCA possibilita verificar a importância de cada variável sobre as amostras. Já os gráficos de *loading* mostram as variáveis de maior influência. Os gráficos de *scores* mostram a diferença e semelhança entre as amostras.

II.2.2.2. Resultados e discussão da caracterização por fluorescência de raios-X

As primeiras componentes principais (PC's) compreenderam a maior parte da variação total dos dados originais. No caso da **Figura 16**, o gráfico de *scores* mostra que as PC1 e PC2 para as amostras de folhas e galho explicam 59% da variância dos dados espectrais. Podemos observar um agrupamento das amostras de folhas e uma separação da amostra de galho. O gráfico de *loadings* (**Figura 17**) mostram algumas faixas espectrais importantes, como a região do

espalhamento de raios-X, Rh K α Compton (19.2 keV), a região K α do Ferro (6,38 KeV), a região K α do Cálcio (3,691 keV) e K α do Estrôncio (14,142 keV).

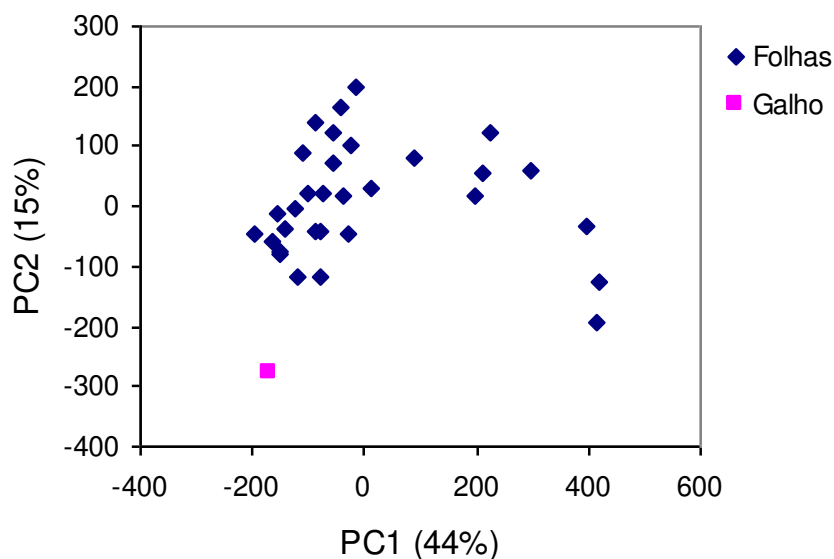


Figura 16. Gráfico de *scores* da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e galho da *A. chica*.

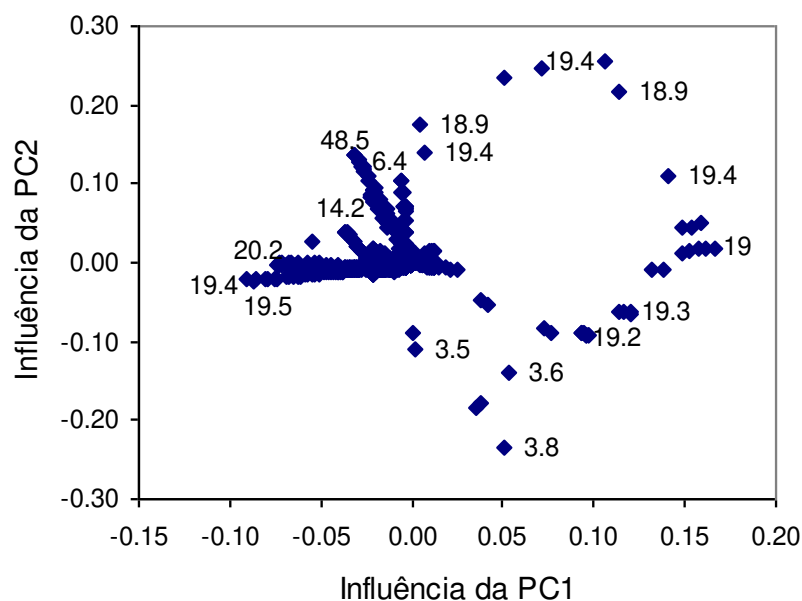


Figura 17. Gráfico de *loadings* para a região entre 0 e 42 keV para as amostras de folhas e galho da *A. chica*.

A amostra de galho apresentou-se separada das demais e por isso foi eliminada para se fazer uma nova análise por PCA que mostrou um agrupamento das amostras conforme a estação de colheita (**Figura 18**).

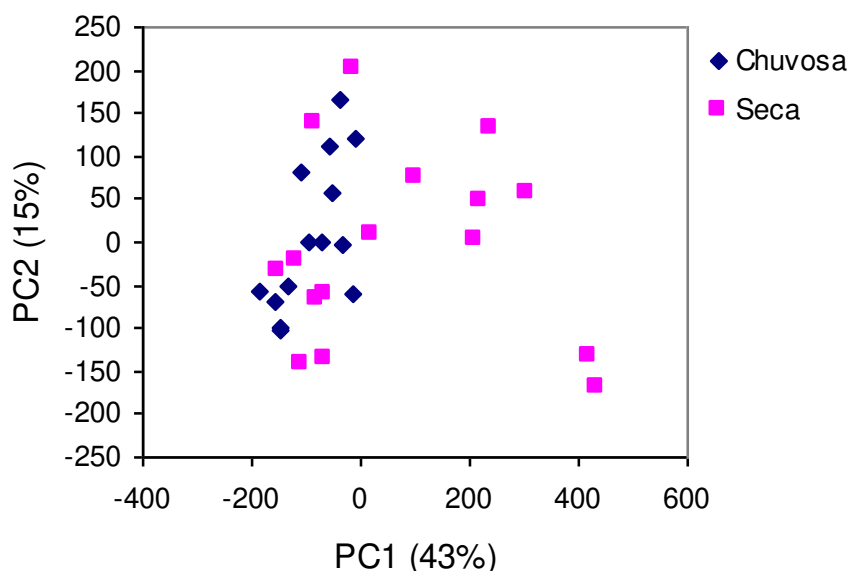


Figura 18. Gráfico de *scores* da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e separados conforme a estação em que as folhas foram colhidas (estação chuvosa e seca).

As amostras colhidas na estação chuvosa mostram um melhor agrupamento entre si, que pode ser justificado pela presença de outros compostos na época da seca. O novo gráfico de *loadings* obtido (**Figura 18**) é muito semelhante ao gráfico anterior (**Figura 16**). As representações gráficas dos *scores* somaram 58% neste caso.

O gráfico de scores da PC2 e PC5 (**Figura 19**) separa as amostras por horário do dia que foram colhidas, início da manhã, meia dia e fim da tarde. As componentes principais 2 e 5, que explicam menos de 15 % de toda a informação relevante, mostram apenas uma tendência na discriminação em grupos relacionados.

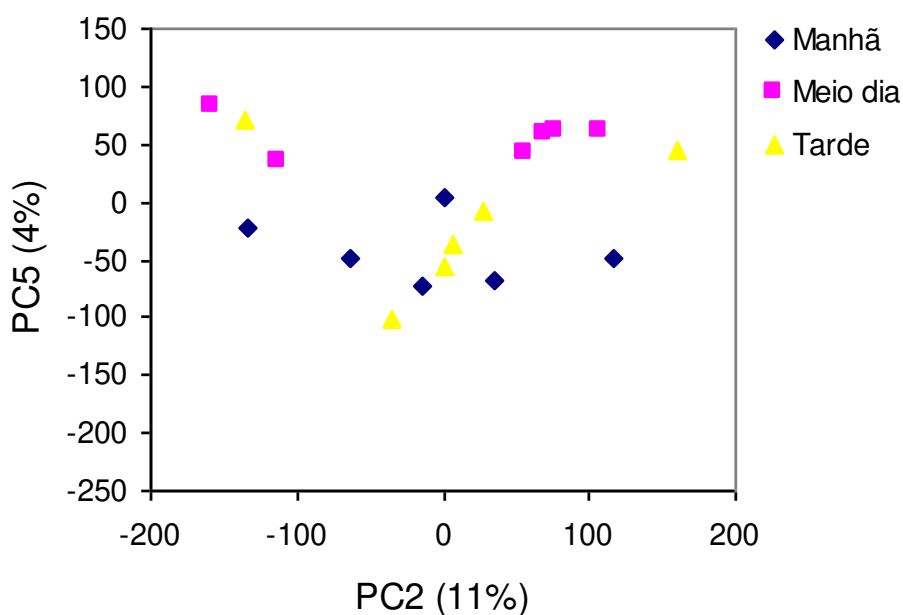


Figura 19. Gráfico de *scores* da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas e separados por período do dia em que as folhas foram colhidas (início da manhã, meio dia ou fim da tarde).

A separação das amostras por variedade (Variedade I, II e III) é obtida confrontando-se as PC2 e PC4 (que juntas explicam 22 % da informação obtida), cujos gráficos de *scores* (**Figura 20**) e de *loadings* (**Figura 21**) são mostrados abaixo. O gráfico de *loadings* (**Figura 21**) mostra algumas faixas importantes como a região do espalhamento de raio-X, Rh K α Compton (19.2 keV) e a região K α do Cálcio (3,691 keV).

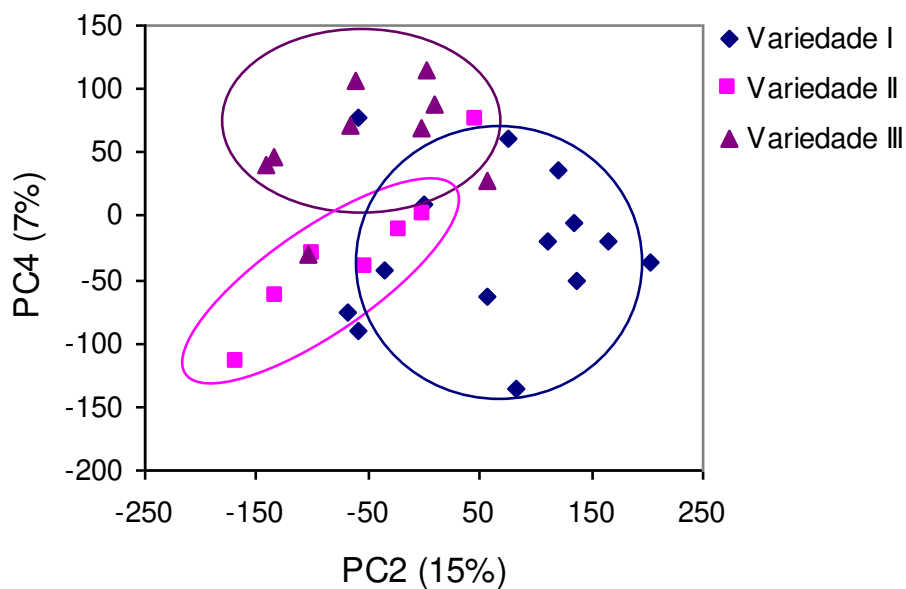


Figura 20. Gráfico de *scores* da região entre 0 e 42 keV extraídos dos espectros das amostras de folhas, classificadas conforme sua variedade (I, II ou III).

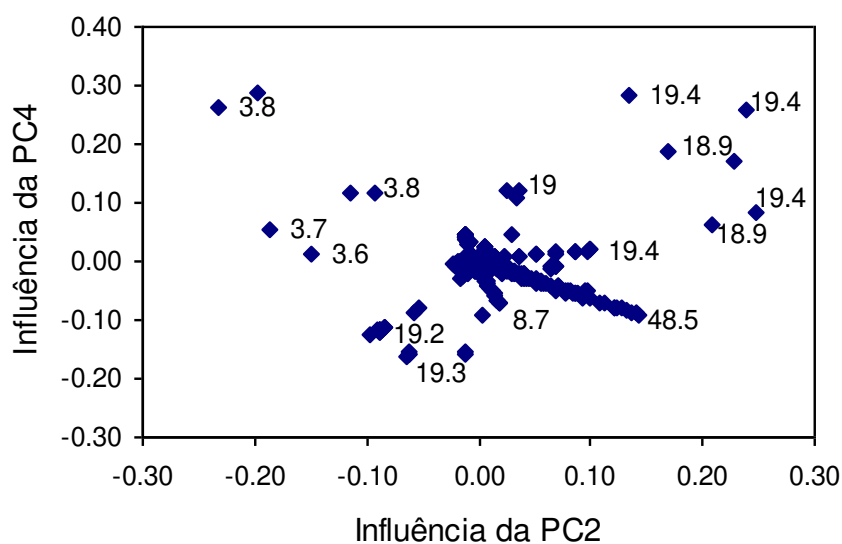


Figura 21. Gráfico de *loadings* para a região entre 0 e 42 keV para as amostras de folhas da *A. chica*, separados variedade (I, II ou III).

Os resultados obtidos com as análises do gráfico de scores do PCA para diferenciação entre as variedades (**Figura 20**) foram satisfatórios e provavelmente estão relacionados a características do genótipo destas plantas. Ao mesmo tempo, o PCA possibilitou ressaltar que há influência da estação (seca ou chuvosa) na colheita das folhas e do local onde foram cultivadas e, portanto, relacionadas a características do fenótipo destas plantas.

A **Figura 22** mostra os espectros sobrepostos das amostras, cuja variância relativa está relacionada com a composição química dos seus constituintes orgânicos.

É importante ressaltar que a região do espalhamento (região relativa à manifestação de compostos formados por elementos leves) descartada com frequência em muitos trabalhos mostra-se aqui de grande importância na obtenção dos atuais resultados.

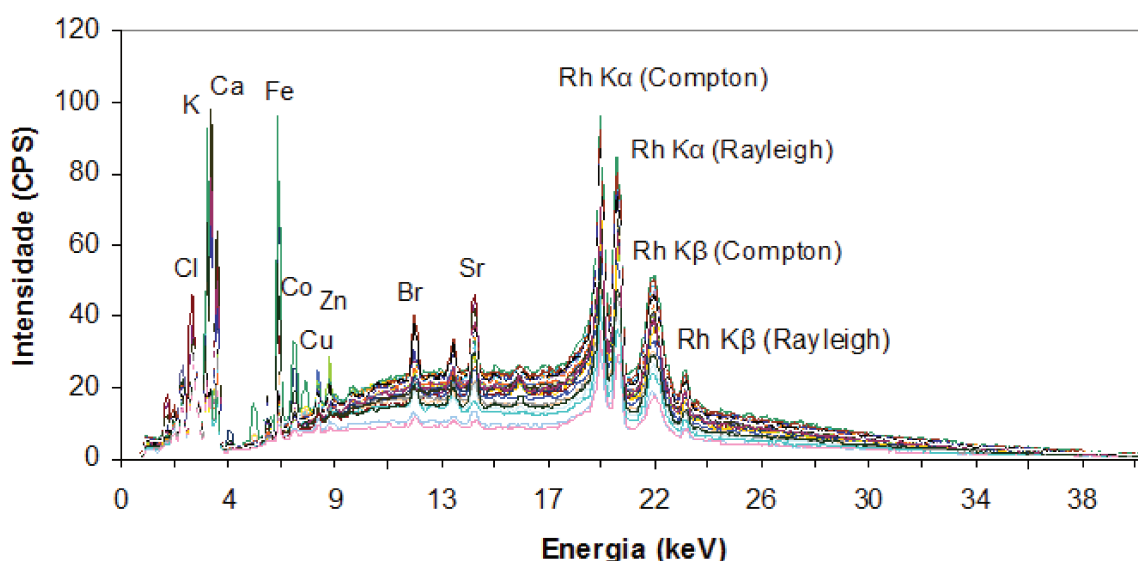


Figura 22. Espectros sobrepostos das amostras da **Tabela 7**.

Na **Tabela 8** encontram-se exemplificados as intensidades dos principais picos dos espectros de raios-X e suas energias de emissão $K\alpha$ para as 32 amostras analisadas (**Tabela 7**). As maiores variações de intensidade foram encontradas para os elementos K, Ca, Fe, Co e o espalhamento Rh (que apresentaram grande influência nos gráficos de *loadings* nas primeiras componentes principais).

Tabela 8. Dados de fluorescência de raios-X dos principais picos de algumas amostras de folhas e de galho da *A. chica* provenientes dos estados de AM, PR, PA e SP.

Variedade	Intensidade (cps) / Energia de excitação (keV)												
	Cl	K	Ca	Fe	Co	Cu	Zn	Br	Sr	Picos espalhamento Rh			
	2,71	3,28	3,66	6,38	7,02	8	8,6	11,88	14,12	19,16	20,14	21,44	22,68
AM1-R-M	33,11	63,44	0,306	27,44	13,33	0,155	0,138	25,22	34,67	0,163	68,89	42,67	19,67
AM1-R-L	30,11	71,89	0,226	23,89	12,56	28,33	24,89	28,78	32,78	0,187	77,44	48,33	23,33
AM1-R-A	30,50	80,33	0,235	23,00	11,78	23,11	20,00	28,22	29,78	0,161	63,67	41,78	18,89
AM1-D-M	30,40	96,56	0,223	23,78	11,67	25,78	21,11	30,33	25,22	0,133	54,89	33,11	15,67
AM1-D-L	31,34	88,78	0,252	26,89	12,22	18,78	14,56	19,44	20,78	0,105	41,67	26,67	12,44
AM1-D-A	30,28	86,11	0,174	38,56	14,89	25,33	20,00	28,22	27,78	0,165	67,11	42,67	19,33
AM2-R-M	29,28	61,89	0,191	12,33	8,56	13,22	12,00	13,00	13,56	71,67	28,67	18,67	8,67
AM2-R-L	31,44	90,78	0,214	24,00	13,11	21,67	19,33	29,33	33,89	0,181	73,33	47,00	22,33
AM2-R-A	31,61	79,22	0,239	24,89	12,33	30,89	24,11	28,78	33,89	0,17	67,78	43,56	19,67
AM2-D-M	26,17	59,56	0,115	13,22	7,78	11,11	9,56	11,78	10,78	65,56	28,44	17,22	8,67
AM2-D-L	29,94	77,33	0,197	35,44	13,89	20,44	16,67	21,22	21,67	0,118	46,22	30,00	13,78
AM2-D-A	30,73	0,134	0,103	20,56	11,33	17,56	17,00	23,33	16,11	96,89	36,78	23,89	10,78
AM3-R-M	30,72	67,22	0,187	17,11	11,11	26,33	34,33	24,22	28,33	0,156	61,56	40,22	17,78
AM3-R-L	30,78	60,33	0,209	16,56	12,11	20,78	17,89	26,33	34,11	0,186	72,89	45,89	20,89
AM3-R-A	32,56	59,33	0,249	23,22	12,67	21,44	19,33	22,22	29,89	0,159	63,33	40,78	18,78
AM3-D-M	29,67	60,67	0,200	19,78	11,33	22,33	18,44	24,67	29,22	0,147	58,00	36,22	17,33
AM3-D-L	29,39	87,44	0,143	17,00	11,44	20,44	17,56	25,33	25,67	0,166	69,56	42,89	19,67
AM3-D-A	29,11	66,11	0,170	17,78	11,56	22,33	17,22	20,67	21,56	0,118	45,89	29,33	13,44
AM1-R1	31,5	61,22	0,256	21,00	12,22	21,56	23,89	40,22	37,89	0,192	80,22	50,78	23,56
AM1-R2	30,61	52,00	0,310	22,56	11,67	21,22	20,78	27,56	38,33	0,155	62,89	38,22	18,44
AM1-D2	30,61	62,67	0,255	23,56	11,56	22,67	19,67	30,00	35,56	0,180	73,78	45,78	22,22
AM2-R1	29,95	60,56	0,201	22,56	12,00	20,22	24,33	37,67	36,56	0,179	72,78	45,89	21,78
AM2-D2	31,44	65,67	0,216	40,67	15,22	19,78	20,78	26,67	35,33	0,176	69,33	44,00	20,44
PA3-R1	30,23	56,78	0,150	31,11	13,89	24,56	22,67	21,89	29,33	0,157	61,00	39,44	17,56
PA3-D1	30,23	44,89	0,158	34,00	15,11	26,78	19,67	22,44	28,78	0,168	64,22	41,78	19,00
PA3-D2	30,95	71,33	0,153	19,67	13,11	22,22	20,22	23,11	31,11	0,177	69,00	45,56	21,33
SP1-R	34,33	65,22	0,319	50,56	16,00	18,67	18,56	20,22	44,78	0,153	65,56	39,22	18,67
SP1-D	37,28	42,56	0,352	55,22	15,44	15,33	18,11	19,00	45,67	0,143	64,89	38,44	19,00
PR1-R1	31,11	0,101	0,256	0,114	25,33	22,78	22,00	23,56	36,11	0,148	63,89	38,33	17,89
PR1-D1	30,61	94,67	0,272	70,67	18,78	19,11	14,78	20,56	30,00	0,112	47,78	29,11	13,78
PR1-D2	32,89	71,11	0,395	39,33	13,44	16,44	14,78	19,22	41,89	0,160	70,11	41,56	20,67
PRG1-R1	32,67	0,141	0,104	0,129	33,00	24,89	25,78	26,89	33,00	0,200	82,78	51,22	24,78

Analisando-se os picos K α do ferro (6,38 keV) tem-se que a intensidade dos picos varia de 12 a 55 cps (excluindo as amostras colhidas no Paraná que apresentaram variação demasiada), resultando numa média de 26 cps (desvio padrão – 10,3). As maiores intensidades ficaram para as amostras colhidas no estado de São Paulo, se estas fossem subtraídas do montante a intensidade média abaixaria para 24 cps e o desvio padrão para 7.

Para encontrar o valor correspondente de Fe nas amostras, recorreu-se aos resultados das amostras padrão. As intensidades dos picos das amostras padrão foram correlacionadas com o conteúdo padrão de ferro das mesmas (**Tabela**

9). E através desta curva de calibração chegou-se nos valores de ferro para as amostras de *A. chica*.

Tabela 9. Amostras padronizadas utilizadas para calibração e seus níveis de ferro.

Amostras padronizadas	Procedência	Número de referência	Conteúdo de ferro (mg/Kg)
Folhas de pêssego	NIST	1547	218
Folhas de maçã	NIST	1515	83
Palmeira	WEPAL	652	95.9
Alfafa	WEPAL	124	221
Cravo	WEPAL	883	1340

Considerando todas as amostras com exceção das do Paraná (apresentaram muita variação entre elas) obtém-se uma intensidade média de 26 cps que equivale a uma concentração média de Fe de 203 mg / kg (variando de 73 a 1713 mg / kg).

Desconsiderando as amostras do Paraná e de São Paulo (intensidade mais altas) obtém-se uma intensidade média de 24 cps que equivale a uma concentração média de Fe de 172 mg/kg (variando de 73 a 914 mg/kg).

Segundo Cardoso e Penteado (1994), para o tratamento de anemia ferropriva, adultos devem ingerir cerca de 60 mg de ferro elementar por dia equivalente a 300 mg de sulfato ferroso. Algumas referências citam quantidade de Fe contida em vários alimentos (AOAC, 2005; TACO, 2011), como exemplo: o agrião com 31 mg/Kg de alimento, o feijão carioca cozido com 13 mg/Kg e o fígado grelhado com 58 mg/Kg. Estes valores são para ferro total, determinado por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado – ICP-OES, segundo AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*).

Comparando-se os valores obtidos para as amostras das folhas de *A. chica* com alguns de referência (TACO, 2011; AOAC, 2005), pode-se dizer que são valores altos, justificando assim o uso popular da planta como anti-anêmica.

II.3. Extração utilizando CO₂ supercrítico

O objetivo do uso da tecnologia de extração com fluidos supercríticos para extração de desoxiantocianidinas a partir de folhas de *A. chica*, foi a exploração de novas técnicas para uma extração mais eficiente e direta, e um indicativo para um processo de produção semi-industrial deste extrato. Paula et al. (2013) descreveram um experimento utilizando folhas de *Arrabidaea chica* Verlot e como solventes dióxido de carbono supercrítico numa primeira etapa e uma mistura de CO₂/etanol/água numa segunda etapa de extração para obtenção de extrato, HPLC foi usado para quantificar carajurina. O processo de extração foi diferente do descrito neste trabalho, Paula et al. (2013) utilizaram CO₂ supercrítico como solvente que passa por um leito fixo contendo as folhas da planta seguido de CO₂ supercrítico saturado com etanol e água. O extrato obtido continha compostos fenólicos (flavonoides, antocianinas) entre outros. Já o processo descrito neste trabalho faz uso de coluna de sílica em série com uma coluna de leito fixo que contém as folhas da planta. CO₂ supercrítico foi utilizado saturado com etanol, e o extrato de interesse foi retido na coluna de sílica. Para obtenção do extrato de interesse, o mesmo foi eluído da sílica e caracterizado por HPLC, obtendo-se assim um extrato concentrado em desoxiantocianidinas livre de impurezas e outros flavonóides.

II.3.1. Material e Métodos

II.3.1.1. Planta e preparação das amostras

A variedade de *A. chica* utilizada neste trabalho foi a variedade I. *A. chica* foi cultivadas em Maringá - PR. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, número de registro UEC 145.956. As folhas foram secas na sombra e depois em estufa a 40 °C por 8 horas, moídas num moedor de plantas até a aparência de um pó fino e peneiradas, sendo a fração entre 150 e 210 µm utilizada nos experimentos.

II.3.1.2. Solventes utilizados

Dióxido de carbono (99,9%) adquirido de White Martins Co. (Campinas, Brazil). Álcool etílico P.A. Vetec[®] e Synth[®]. Diclometano P.A., hexano P.A., metanol P.A., ácido clorídrico concentrado P.A. Synth[®], sílica G60, Merck.

II.3.1.3. Extração com CO₂ supercrítico saturado com etanol

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fluidos Supercríticos na Faculdade de Engenharia Química (FEQ, Unicamp), sob responsabilidade do Prof. Dr. Teo Kieckbush em colaboração com o aluno Uiram Kopcak.

O equipamento utilizado foi projetado pelo grupo de pesquisa de extração supercrítica da Faculdade de Engenharia Química (FEQ)/Unicamp. O equipamento experimental de fluxo semi contínuo permite controle independente da temperatura e pressão suportando pressões de 41.3 MPa e temperaturas de 200 °C (**Figura 23**). Os principais componentes incluem bomba de deslocamento positivo para solventes (P1), vaso de alta pressão de 300 mL para extração com leite fluidizado (E), coluna cromatográfica com enchimento de sílica (C) e frasco coletor. O vaso extrator envolto por manta de aquecimento e controlador de temperatura opera em série com a coluna de sílica. A linha foi mantida aquecida para prevenir congelamento do solvente e a saída da bomba resfriada para manter constante a vazão do solvente. Medidores de vazão foram utilizados para se garantir fluxo constante e eram conectados num computador (FM). Válvulas foram utilizadas para controle do fluxo.

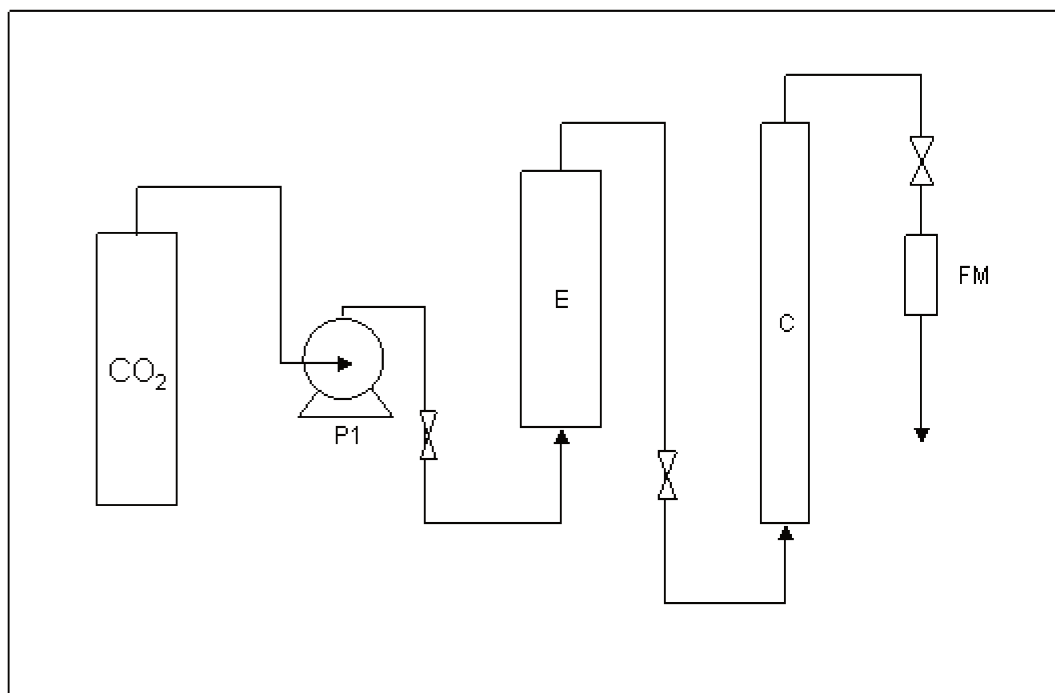


Figura 23. Esquema do equipamento experimental utilizado. E é o extrator onde são colocadas as folhas moídas. C a coluna de sílica.

Testes preliminares foram realizados para obtenção das condições de processo. Os parâmetros de processo estudados foram temperatura e pressão.

As folhas foram extraídas com hexano em Soxhlet por 10 horas para retirada de substâncias apolares. As folhas umedecidas tiveram o solvente evaporado em capela. O leito fluidizado foi preparado com uma camada de algodão, uma camada de esferas de vidro, 12 g das folhas de *A. chica* previamente extraídas com hexano, camada de esferas de vidro novamente e nova camada de algodão para finalizar. A coluna em série com o extrator medindo 40 x 3 cm foi empacotada com sílica G60. A temperatura do leito permaneceu em torno de 40 °C e a pressão de operação foi de 5100 psi. Etanol foi utilizado como co-solvente, desta maneira o CO₂ supercrítico foi saturado com etanol antes de passar pelo leito fluidizado e logo em seguida pela coluna preenchida com sílica, onde as substâncias coloridas, principalmente as desoxiantocianidinas, foram retidas. As extrações foram realizadas com uma vazão de 1 L / min de CO₂ nas CNTP (após a despressurização). Para uma amostra de 12 g de folhas trituradas, 240 L de CO₂ foram utilizados (nas CNTP). O experimento foi realizado em duplicata.

Após a finalização do experimento (duração de 4 horas), a coluna de sílica foi retirada do experimento e após a sílica secar por completo, foi completamente retirada da coluna. As substâncias retidas na sílica foram extraídas num frasco Erlenmeyer com 300 mL x 3 de solução de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (70:30 v/v) acidificado com solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,01 %. Após a extração a mistura foi filtrada em funil de placa de vidro sinterizado. A solução obtida foi concentrada em rota-evaporador seguida de liofilização. Os extratos obtidos nos dois experimentos realizados em duplicata tiveram massas de 0,21 e 0,26 g respectivamente, totalizando um rendimento final do extrato de cerca de 2 % (m/m). O extrato foi solubilizado em metanol e denominado de SC-Me. Antes da purificação, o extrato SC-Me foi diluído em água na proporção de (1:2 v/v) e inseridos nas mini-colunas de Sep-Pak C18 para purificação. A ativação prévia das colunas se deu conforme descrito anteriormente no item **II.1.1.3**. O material retido na coluna foi lavado primeiramente com quantidade equivalente a três volumes da mini-coluna de solução de ácido clorídrico a 0,01 % com o objetivo de eluir os açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e outros compostos solúveis em água remanescentes no extrato. Depois deste procedimento, as 3-desoxiantocianidinas foram separadas de compostos fenólicos eluindo-se uma solução de metanol:água (2:1 v/v) contendo solução de ácido clorídrico a 0,01 %. A fração resultante extraída foi concentrada usando-se rota-evaporador e banho à 35 °C, resultando num extrato denominado de SC-3DAE. Os extratos SC-Me e SC-3DAE foram filtrados em membrana de 0,45 μm e analisados em HPLC-DAD.

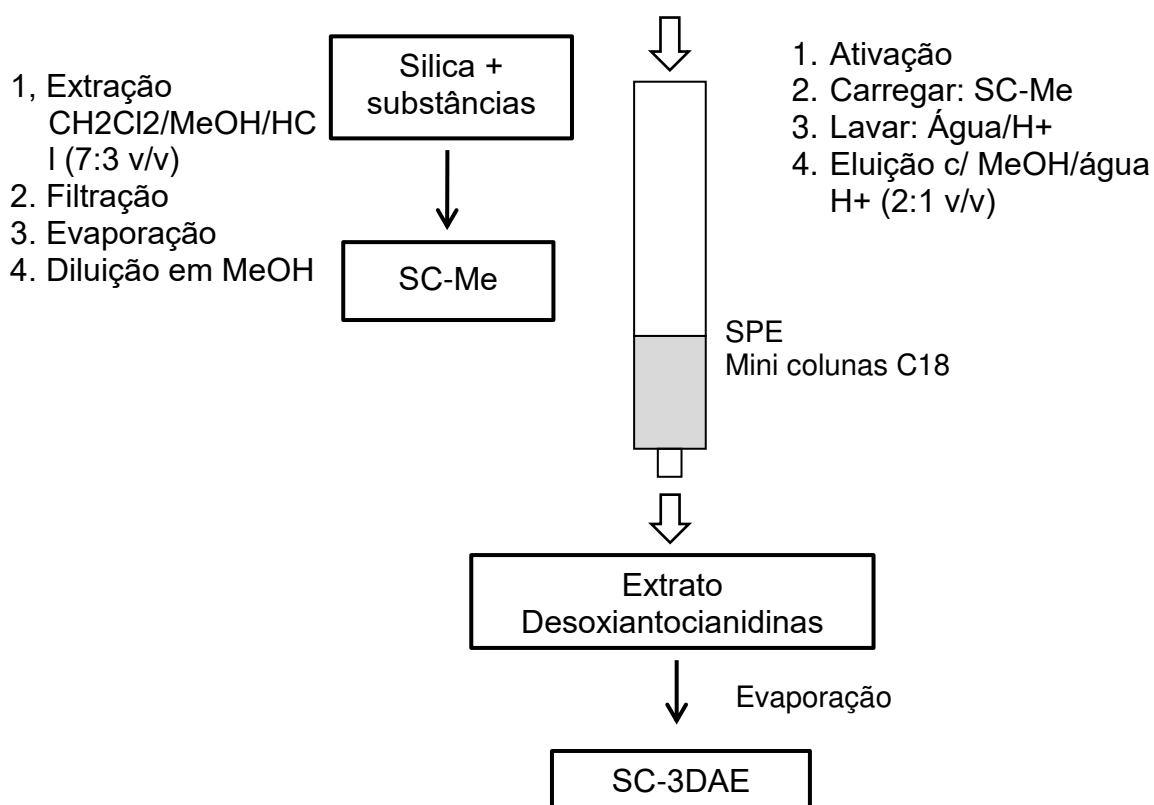
II.3.2. Resultados e discussão

A análise em HPLC-DAD seguiu as mesmas condições utilizadas em **II.1.1.4.2**. O cromatograma resultante se assemelha ao cromatograma da caracterização do extrato 3DAE descrito em **II.1.2.2**. (**Figura 8**).

O método de extração com fluido supercrítico permitiu separar as desoxiantocianinas, o extrato SC-3DAE gerou um cromatograma com 3 picos atribuídos como **S-1**, **S-2**, e **S-3** com área total em torno de 95 %. A atribuição dos picos, de modo similar ao realizado em **II.1.2.3** foram baseados nas análises de HPLC-DAD com confirmação em ESI-MS/MS. Os três picos do cromatograma resultante da análise em HPLC-DAD foram considerados puros já que para cada

pico os espectros de UV em três diferentes posições (início, ápice e final do pico) apresentaram os mesmos perfis, indicando uma única substância. Quando comparados os rendimentos do extrato SC-Me com o Extrato MEOH/H⁺ (item II.1.1.3) antes da purificação utilizando SPE, tem-se 2 e 1,3 % respectivamente, mostrando uma maior eficácia para a extração com fluido supercrítico.

Importante ressaltar a importância da etapa de SPE para purificação do extrato já que o extrato metanólico antes desta etapa apresentou um cromatograma de HPLC com picos das mesmas 3-desoxiantocianidinas com co-eluição de impurezas.



II.4. Conclusão do capítulo

Foram apresentadas metodologias de extrações com solventes e utilizando fluido supercrítico para extração e concentração das 3-desoxiantocianidinas a partir das folhas da *A. chica*. Estas metodologias propiciaram a obtenção de extratos que podem ser utilizados para avaliação das 3-desoxiantocianidinas frente a atividades de diferentes micro-organismos assim como em formulações cosméticas.

Utilizando-se apenas uma sequência de extrações seguida de SPE obteve-se um extrato rico em 3-desoxiantocianidinas denominado de 3DAE. As técnicas de HPLC-DAD, ESI-MS, ESI-MS/MS e HPLC-MS/MS confirmaram ser ferramentas rápidas para identificar e caracterizar as 3-desoxiantocianidinas requerendo simples preparação de amostras.

O método de extração com fluido supercrítico conseguiu separar as desoxiantocianinas, foram identificadas através de HPLC-DAD 3 desoxiantocianidinas no extrato SC-3DAE contendo com área total dos picos em torno de 95 %. Importante ressaltar a importância da etapa de SPE para purificação final do extrato.

Comparando-se os dois extratos concentrados nas 3-desoxiantocianidinas antes da purificação final utilizando SPE, o método de extrações sucessivas e com fluido supercrítico resultaram em rendimento de 1,3 e 2 % respectivamente, sugerindo um maior aproveitamento para o segundo método. E confirmando a maior seletividade do método de fluido supercrítico além de outras vantagens como baixo uso de solventes e reduzida geração de resíduos

Foram também desenvolvidas metodologias de caracterização de extratos concentrados em 3-desoxiantocianidinas, considerando folhas provenientes de várias partes do país e utilizando técnicas modernas de espectrometria de massas e fluorescência de raios-X. Com auxílio de PCA foi possível mostrar uma diferenciação nas variedades da planta assim como mostrar a influência da sazonalidade nesta caracterização.

Capítulo III: Atividade Biológica de Extratos das Folhas da *A. chica*

III.1. Material e Métodos

III.1.1. Planta

As folhas da *A. chica* utilizadas nestes experimentos foram do tipo I, cultivada na cidade de Maringá, estado do Paraná. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o registro UEC 145.956. Após coleta, as folhas foram secas à sombra e depois na estufa a 40 °C por 8 horas.

III.1.2. Solventes e reagentes utilizados

Álcool etílico utilizado nas extrações, Vetec e Synth. Diclorometano P.A., clorofórmio P.A., hexano P.A., acetato de etila P.A., metanol P.A., ácido clorídrico concentrado P.A Synth. Dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich). Ácido fórmico 50 % HPLC (Fluka) e acetonitrila HPLC (Sigma-Aldrich).

L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) com 2 % de glicose tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfilenopropanossulfônico MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA).

III.1.3. Preparação de extratos e frações

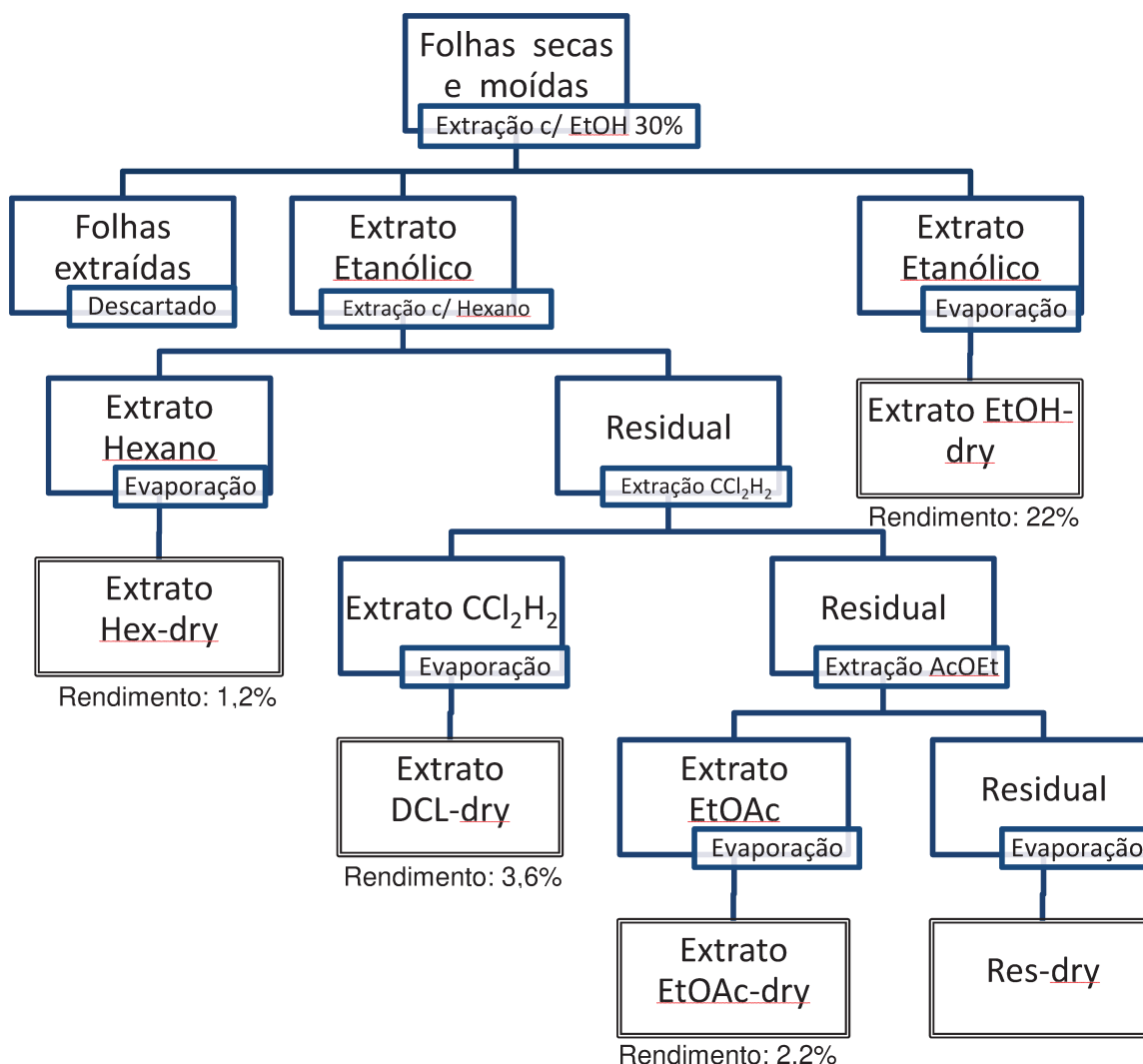
Uma quantidade de folhas moídas, 50 g, foi extraída com agitação constante com 500 mL de solução de etanol 30 % à temperatura ambiente por 1 hora na ausência de luz. Após a extração a solução foi filtrada em filtro de papel usando funil de Büchner e vácuo. O resíduo retido no filtro de papel foi lavado 3 vezes com 20 mL de solução etanólica 30 %, a solução incorporada ao filtrado e novamente filtrado à vácuo em funil de placa porosa. O filtrado foi então concentrado em rota-evaporador a vácuo em banho-maria de 35 °C e em seguida liofilizado até obter um extrato em pó, EtOH-dry, com 22 % de rendimento em relação às folhas secas. Outras extrações foram realizadas com soluções de etanol de diferentes concentrações (0 % etanol, 50 % etanol, 70 % etanol e 100 % etanol) seguindo o mesmo procedimento descrito acima e gerando extratos secos EtOH0-dry, EtOH50-dry, EtOH70-dry, EtOH100-dry. Estes extratos foram utilizados nos ensaios de

atividade antimicrobiana que resultaram em maior atividade para a solução etanólica 30% (extrato seco **ETOH-dry**). A partir deste *screening* inicial, as extrações abaixo foram realizadas.

Novamente a mesma extração acima foi repetida e o extrato final foi particionado utilizando uma extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: hexano (3 x 200 mL), diclorometano (3 x 200 mL) e acetato de etila (3 x 200 mL). Os solventes foram evaporados utilizando um evaporador a vácuo a temperatura de 35 °C. Pequenas porções de etanol absoluto foram adicionadas ao extrato evaporado e novamente evaporado em rota-evaporador com o objetivo de remover a água residual das frações. Os extratos secos foram identificados como: **Hex-dry**, **DCL-dry** e **EtOAc-dry**. Hex-dry foi proveniente da fração hexânica com 1,2 % de rendimento, DCL-dry proveniente da fração diclorometano com 3,6 % de rendimento e EtOAc-dry proveniente da fração acetato de etila com 2,2 % de rendimento. Todos os rendimentos foram calculados em relação ao material seco inicial. A fração residual etanol / água foi evaporada e posteriormente liofilizada resultando no extrato **Res-dry**.

As frações e extratos descritos acima foram resultado de vários estudos quali e quantitativos como a otimização da concentração de etanol em água na primeira extração conforme descrito acima, o tempo de extração das folhas moídas, a temperatura de extração, a escolha do solvente de polaridade intermediária: diclorometano e clorofórmio (o que resultou num favorecimento para o diclorometano levando em conta os parâmetros relatados em seguida) dentre outros. As otimizações levaram em conta o rendimento das extrações, os perfis de HPLC e mais importante, a atividade antimicrobiana dos extratos.

Além dos extratos acima o extrato rico em 3-desoxiantocianidinas, denominado **3DAE**, descrito no item **II.1.1.3** também foi investigado frente à atividade antimicrobiana.



III.1.4. Caracterização de extratos por LC-MS e LC-MS/MS

Para caracterização das amostras foi utilizado um systems UPLC (*ultra performance liquid chromatograph*, ou em português CLUE, cromatografia líquida de ultra eficiência, Acquity Waters, Milford, MA) acoplada a um espectrômetro de massa sequencial (TQD, Quattro Micro API® Waters Canada). Foi utilizada uma coluna Acquity® UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm i.d., 1,7 µm), Waters (Milford, MA) com temperatura de 37 °C. O solvente A usado foi uma solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e a solução B acetonitrila (grau HPLC) acidificado com 0,1 % de ácido fórmico.

Foi utilizado um gradiente de 5 a 20 % de B (0 – 4 min) e 20 a 70 % de B (4 – 8 min) com fluxo de solvente de 0,35 mL / min. As análises foram efetuadas usando ESI no modo positivo, com voltagem da agulha de 1,0 kV; voltagem de cone de 20,0 V; gás (nitrogênio) nebulizador a 60 psi; cortina de gás a 25 psi e energia de colisão de célula de 30 eV. A temperatura de aquecimento do turbo-íon spray utilizada foi de 200 °C e a vazão do gás de aquecimento de 800 L / h. O reconhecimento dos picos foi feito utilizando literatura publicada, espectros e dados de fragmentação. A identificação das frações foi feita utilizando XIC (*extracted ion chromatogram* em inglês, que se trata de um cromatograma de íons criado com base nos valores de massa de interesse a partir do espectro de massas completo) baseando-se nos íons já identificados em literatura (Capítulo II) assim como nas referências (TAKEMURA et al. 1995, ZORN et al. 2001 e DEVIA et al. 2002) para as 3-desoxiantocianidinas e flavonas já isolados da folhas da *A. chica*. Caracterização foi realizada utilizando-se LC-MS/MS e os fragmentos identificados utilizando a literatura e fragmentações sugeridas.

III.2. Atividade Antimicrobiana

Ensaio realizado sob responsabilidade da Profa. Dra. Angélica Z. Schreiber no departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Unicamp, em colaboração com sua assistente Luzia Lyra.

III.2.1. Preparação das amostras para os testes de atividade antimicrobiana

O extrato EtOH-dry foi dissolvido em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) e água na proporção de (1:1) para uso em experimentos biológicos, a solução resultante foi chamada de EtOH-dil. Os demais extratos, Hex-dry, DCL-dry, EtOAc-dry e 3DAE foram diluídos em DMSO e chamados de Hex-dil, DCL-dil, EtOAc-dil e 3DAE-dil, respectivamente. O extrato Res-dry foi diluído com uma solução de DMSO / água (2:0,5) e denominado Res-dil. Os extratos foram subsequentemente diluídos em água em concentrações que variaram de 10 a 1000 µg / mL para dermatófitos e 100 a 1000 µg / mL para leveduras.

III.2.3. Cepas Microbianas

Dermatófitos: 32 cepas clínicas foram utilizadas, 26 de *Trichophyton* (*T. mentagrophytes* e *T. rubrum*) e 6 de *Microsporum* (*M. gypseum* e *M. canis*). As cepas foram obtidas a partir da coleção de fungos do Laboratório de Investigação de Fungos (LIF) na Escola de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Leveduras: 3 cepas padrão foram utilizadas, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

III.2.4. MIC e MFC

A atividade antimicrobiana das diferentes amostras descritas em III.1.3 e III.2.1 foi investigada utilizando-se MIC e MFC, sendo MIC *minimum inhibition concentration* ou concentração inibitória mínima e MFC *minimum fungicidal concentration* ou concentração fúngica mínima.

A metodologia utilizada para o teste dos fungos filamentosos foi baseada na microdiluição em caldo para susceptibilidade de fungos (metodologia M38-A2) descrita pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008). O meio de cultura utilizado nas avaliações foi padrão RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio com 2 % de glicose tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfilenopropanosulfônico MOPS. Para as avaliações foram utilizadas placas de microtitulação esterilizadas com fundo chato de 96 micro poços.

Os extratos dissolvidos em DMSO descritos em **III.2.1** foram adicionados ao meio de cultura com inóculo de fungo de 1×10^3 CFU / mL em concentrações que variaram de 100 a 7000 µg / mL para as leveduras e de 10 a 1000 µg / mL para os dermatófitos. As placas de micro titulação foram incubadas por 7 dias a temperatura ambiente. A mais baixa concentração sem crescimento de fungos visível foi definida como MIC 100 %, significando que 100 % do crescimento dos fungos foi inibido. A concentração em que ocorreu 80 % de inibição do crescimento foi definida como MIC 80 %. Os valores de MFC foram determinados pelo cultivo em série de 10 µL retirados de cada poço da placa de microtitulação onde não houve crescimento visível de fungos. O cultivo se deu em placas de ágar Sabouraud e incubação de 7 dias à temperatura ambiente. A mais baixa concentração sem crescimento visível foi definida como MFC indicando a eliminação do inóculo original. As análises foram sempre conduzidas em duplicata.

III.2.5. Resultados e Discussão

III.2.5.1. Atividade antifúngica

Os extratos diluídos EtOH-dil, Hex-dil, DCL-dil, EtOAc-dil e Res-dil foram primeiramente submetidos a testes de susceptibilidade frente a 3 cepas padrão de leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) e 2 cepas padrão de dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*) utilizando-se testes de diluição para avaliar o MIC e o MFC. Os extratos que mostraram maior atividade antimicrobiana foram EtOH-dil, Hex-dil, DCL-dil e EtOAc-dil, principalmente contra dermatófitos. Para as leveduras os valores mais baixos com MIC 100 % variaram de 400 a 4000 µg / mL e MFC variando de > 500 a > 7000 µg / mL. Os dermatófitos foram os que apresentaram o

melhor desempenho, com MIC 100 % variando entre <100 e 300 µg / mL e MFC variando entre < 100 e 1000 µg / mL para os extratos com maior atividade (EtOH-dil, Hex-dil, DCL-dil e AtOAc-dil) (**Tabela 10**).

Tabela 10. Atividades iniciais para extratos das folhas da *A. chica* frente a cepas padrões.

Microorganismos testados	Frações da <i>Arrabidaea chica</i>									
	EtOH-dil		Hex-dil		DCL-dil		EtOAc-dil		Res-dil	
	MIC*100% MFC**		MIC 100% MFC		MIC 100% MFC		MIC 100% MFC		MIC 100% MFC	
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	400	≥7000	1500	1500	≥500	≥500	2500	≥5000	≥7000	≥7000
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	400	≥7000	1000	1500	≥500	≥500	2500	≥5000	≥7000	≥7000
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	400	≥7000	1500	1500	≥500	≥500	4000	≥5000	≥7000	≥7000
<i>T. mentagrophytes</i> LIF 10	≤100	≤100	50-400	400	200	1000	300	1000	1000	1000
<i>T.rubrum</i> LIF 142	≤100	≤100	50-200	≥100	300	1000	≥300	≤1000	1000	1000

* MIC: concentração inibitória mínima expressa em µg / mL

** MFC: concentração fúngica mínima expressa em µg / mL

As frações mais ativas foram então testadas contra outras cepas clínicas de dermatófitos (**Tabela 11**), chegando nos seguintes resultados:

- MIC 100% abaixo de 100 µg / mL para o extrato Hex-dil para cepas de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. gypseum* e *M. canis*.
- MIC 80% abaixo de 2.5 µg / mL para o extrato de DCL-dil e de EtOAc-dil para cepas de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.
- MFC abaixo de 100 µg / mL para o extrato Hex-dil para cepas de *T. rubrum* e *M. canis*.

A inibição destas mesmas cepas de dermatófitos frente a drogas comerciais como a anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e itraconazol também foram avaliadas como controles positivos e comparadas com os resultados obtidos para as frações mais estáveis (**Tabela 12**). Os resultados são considerados muito bons em se tratando de MIC 100 %, já que muitas referências bibliográficas divulgam resultados de MIC 80 % e muitas vezes superiores a estes valores (item 1.2.4).

Os extratos e frações estudados são misturas complexas contendo vários compostos químicos. Com o objetivo de encontrar os compostos responsáveis para a atividade anti-dermatófito observada, foram também investigados extratos concentrados em desoxiantocianidinas. O extrato concentrado nas desoxiantocinidinas, 3DAE, descrito no item **II.1.1.3** assim como a desoxiantocianidina purificada e concentrada descritas no item **II.1.1.5**, íon 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílico, **S-3**, item **II.1.1.5**, foram avaliados frente a dermatófitos utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente. O resultado, porém, não foi importante. Supõe-se, portanto, que os extratos / frações com melhores resultados mostrados neste capítulo devam conter substâncias que provocam sinergia e assim potencializam a atividade dos mesmos frente às diferentes cepas testadas.

Tabela 11. Resultados de MICs e MFCs das frações mais ativas das folhas da *A. chica* frente a cepas clínicas de dermatófitos.

Cepas clínicas de <i>Trichophyton</i> e <i>Microsporum</i> spp		Frações das folhas da <i>Arrabidaea chica</i>								
		Hex-dil			DCL-dil			EtOAc-dil		
		MIC 80%	MIC 100%	MFC	MIC 80%	MIC 100%	MFC	MIC 80%	MIC 100%	MFC
LIF-9	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	400	>500	10	200	1000	10	300	>1000
LIF-10	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	50-400	400	2,5	200	1000	2,5	300	1000
LIF-11	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	>500	5	200	400	5	>300	400
LIF-47	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	200	5	300	1000	10	>300	1000
LIF-178	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	200	5	200	1000	5	>300	1000
LIF-208	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	200	30	>300	1000	20	>300	1000
LIF-393	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	200	5	>300	>1000	10	>300	>1000
LIF-438	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	300	30	300	1000	50	>300	1000
LIF-508	<i>T.mentagrophytes</i>	<10	200	200	20	300	400	1	>300	>1000
LIF-12	<i>T.rubrum</i>	<10	400	>500	10	200	1000	30	>300	1000
LIF-45	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	2,5	300	>1000	5	>300	1000
LIF-142	<i>T.rubrum</i>	<10	50-200	100-200	5	300	1000	10	>300	1000
LIF-207	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	40	300	1000	50	>300	1000
LIF-233	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	10	300	1000	2,5	>300	1000
LIF-249	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	20	200	1000	5	300	1000
LIF-280	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	10	300	500	5	>300	400
LIF-367	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	10	200	1000	20	300	500
LIF-371	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	100	300	>1000	50	>300	>1000
LIF-434	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	100	200	1000	300-200	>300	400
LIF-437	<i>T.rubrum</i>	<10	200	200	200-100	300	1000	200	>300	1000
LIF-1158	<i>T.rubrum</i>	-	-	-	40	300	1000	10	>300	1000
LIF-1172	<i>T.rubrum</i>	-	-	-	40	200	1000	200	300	1000
LIF-1321	<i>T.rubrum</i>	-	-	-	20	200	1000	30	300	1000
LIF-424	<i>Trichophyton sp</i>	<10	200	400	50	300	1000	>300	>300	1000
LIF-509	<i>Trichophyton sp</i>	<10	200	200	20	300	1000	20	>300	>1000
LIF-547	<i>Trichophyton sp</i>	<10	200	200	20	300	1000	20	>300	1000
LIF-64	<i>M.gypseum</i>	<10	100	200	200-100	300	>1000	200	300	>1000
LIF-229	<i>M.gypseum</i>	<10	100	200	20	300	>1000	100	>300	>1000
LIF-412	<i>M.gypseum</i>	<10	100	>500	20	300	>1000	40	300	>1000
LIF-463	<i>M.gypseum</i>	<10	500	500	5	>300	>1000	5	>300	>1000
LIF-343	<i>M.canis</i>	<10	100	100	100	300	>1000	200	300	>1000
LIF-673	<i>M.canis</i>	<10	200	500	30	300	400	20	300	1000

* MIC: concentração inibitória mínima expressa em µg/mL

** MFC: concentração fúngica mínima expressa em µg/mL

Tabela 12. Resultados de MIC e MFC para frações das folhas da *A. chica* e drogas comerciais frente a cepas de dermatófitos.

Microorganismos	Frações das folhas da <i>A. chica</i>			Droga comercial			
	Hex-dil	DCL-dil	EtOAc-dil	Anfotericina B	Fluconazol	Cetoconazol	Itraconazol
	MIC 100%						
<i>T.mentagrophytes</i>	200-500	200->300	300->300	0.5-2	8-64	0.5-2.0	0.13-1.0
<i>T.rubrum</i>	50-400	200-300	300->300	0.5-2	2-32	0.25->128	0.13-0.5
<i>M.gypseum</i>	100-500	300->300	300->300	2	32	0,5	1
<i>M.canis</i>	100-200	300	300	1	0.25-8	0,25	1

* MIC: concentração inibitória mínima expressa em µg/mL

III.2.5.2. XIC LC-MS: perfil dos extratos ativos

Os perfis XIC (*extracted ions chromatogram*) das frações ativas contra dermatófitos mostraram a presença de vários íons flavíliuns. Estes íons mostram semelhança com compostos já isolados das folhas de *A. chica* (CHAPMAN et al., 1927; DEVIA et al., 2002; TAKEMURA et al., 1993; ZORN et al., 2001). As frações descritas em III.1.3 que mostraram maior atividade antimicrobiana, Hex-dry, DCL-dry e EtOAc-dry foram diluídas em acetonitrila (grau HPLC) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, e denominadas Hex, DCL, EtOAc respectivamente. A **Figura 24** mostra os perfis XIC das frações para **S-1** (m/z 301 $[M]^+$), **S-2** (m/z 285 $[M]^+$), **S-3** (m/z 299 $[M]^+$) e **S-4** (m/z 315 $[M+H]^+$). Os perfis XIC também mostram pela primeira vez a presença de isômeros de **S-1** (**S-1a**, **S-1b**, **S-1c** e **S-1d**). Análises da fração Hex usando XIC revelou a presença do isômero **S-1c** e das substâncias **S-2** e **S-4**. Para as frações DCL e EtOAc a presença dos isômeros **S-1a**, **S-1b**, **S-1c** e **S-1d** (este último apenas para DCL) assim como **S-3**.

Com o objetivo de caracterizar as estruturas das substâncias **S-1**, **S-2**, **S-3** e **S-4**, foram realizados alguns experimentos utilizando LC-MS/MS. A **Tabela 13** mostra os principais fragmentos dos íons **2-5**. A atribuição aos picos foi realizada utilizando dados de literatura (TAKEMURA et al., 1995; ZORN et al., 2001; DEVIA et al., 2002). Dados cromatográficos indicam que **S-1** (m/z 301 $[M]^+$) pode apresentar quatro ou mais isômeros diferentes (**S-1a**, **S-1b**, **S-1c** e **S-1d**). OS isômeros **S-1a** e **S-1d** têm o mesmo perfil de fragmentação, perdem um fragmento de metila para formar um fragmento de m/z 286 ($[M]^+$) e como proposto aqui todos perdem um fragmento de m/z 133 (referente a $C_8H_5O_2$) para formar um fragmento de m/z 168. Os isômeros **S-1b** e **S-1c** têm o mesmo perfil de fragmentação, apresentando como

pico base m/z 121. No caso de **S-2** (m/z 285 $[M]^+$), **S-3** (m/z 299 $[M]^+$), **S-3** (m/z 315 $[M]^+$), os íons moleculares também perdem preferencialmente uma metila para formar um fragmento de m/z 270, m/z 284 e m/z 300, respectivamente como principal fragmento.

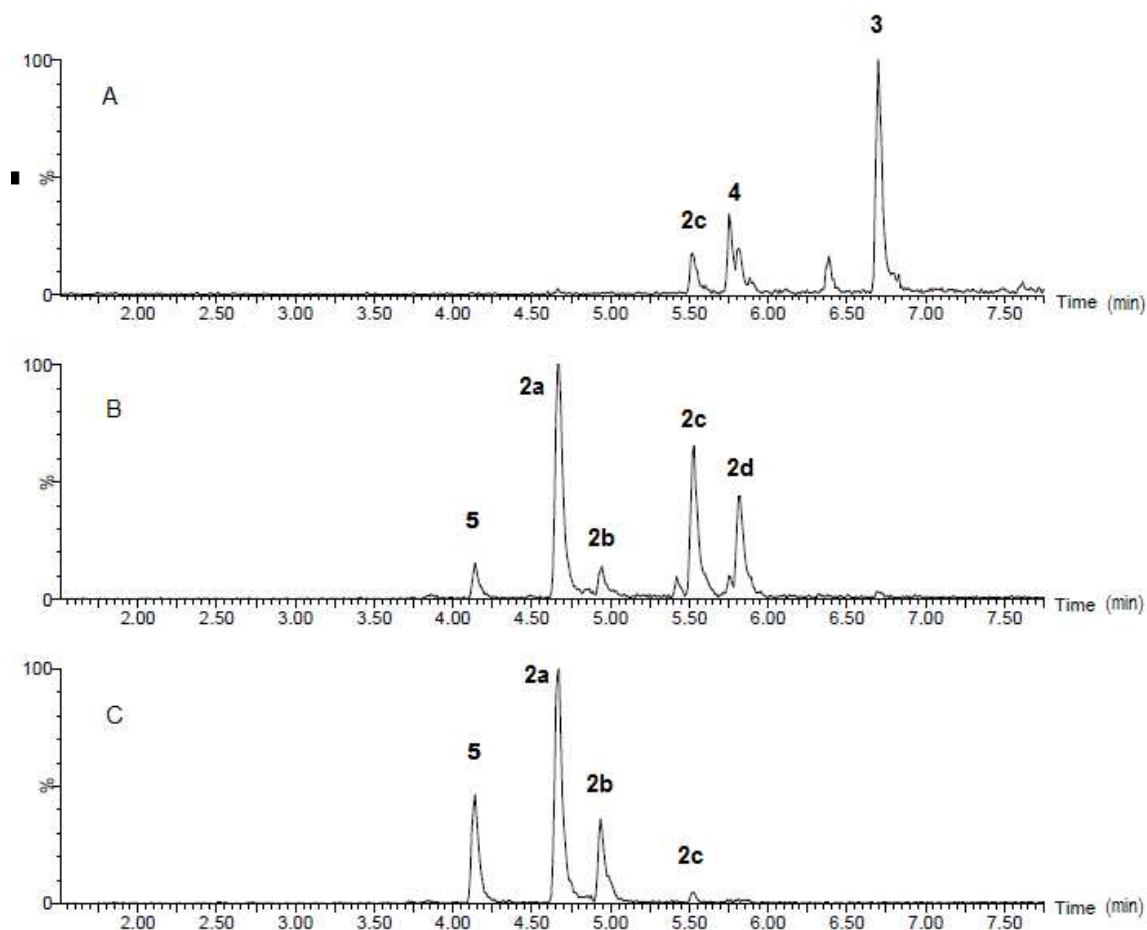


Figura 24. Perfis XIC para os extratos Hex (A), DCL (B) e EtOAc (C). **S-1** refere-se a m/z 301 e seus isômeros; **S-2** a m/z 285, **S-3** a m/z 299, **5** a m/z 315.

Tabela 13. Dados cromatográficos para as 3-desoxiantocianidinas encontradas em frações com atividade antimicrobiana das folhas da *A. chica*.

Substância	Fração	[M] ⁺ (m/z)	Fragmentos (m/z)
S-1a	DCL, EtOAc	301	286, 168
S-1a	DCL, EtOAc	301	121, 145
S-1a	Hex, DCL, EtOAc	301	121, 145
S-1a	DCL	301	286, 168
S-2	Hex	285	270, 242
S-3	DCL, EtOAc	299	284, 269
S-4	Hex	315	300

III.2.6. Conclusão

Três diferentes frações de *A. chica* se mostraram ativas contra *Trychophyton* spp., são eles: Hex-dry, DCL-dry e EtOAc-dry. As frações foram caracterizadas por XIC utilizando LC-MS/MS e pela primeira vez isômeros de uma das raras 3-desoxiantocianidinas, a **S-1**, foram detectadas ao lado de outras substâncias características da *A. chica*.

A fração rica em 3-desoxiantocianidinas denominado **3DAE**, mostrou baixo nível de atividade comparada com outros extratos testados, concluindo que estas substâncias não são responsáveis pela atividade antifúngica encontrada, ou se o forem são necessárias substâncias sinérgicas que atuem em conjunto com elas para apresentar atividade.

III.3. Outras atividades de extratos das folhas da *A. chica*

III.3.1. Atividade anti-inflamatória e cicatrizante

Os testes para avaliação das atividades anti-inflamatória e cicatrizante foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Daniela de A. Cabrini, Laboratório de dor, febre e inflamação, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, UFPR, Maringá, PR.

III.3.1.1. Amostras testadas

As amostras testadas foram: 3DAE e EtOH-dry (descritos em II.1.1.3 e III.1.3) e **S-3** conforme descrito em II.1.1.5.

III.3.1.2. Descrição dos testes

Dois modelos foram usados para avaliação dos extratos:

- Edema de orelha: induzido por óleo de cróton, a espessura da orelha foi medida antes e após a indução da inflamação.
- Cicatrização após incisão: Os animais foram submetidos à incisão dorsal e tratados com os extratos. O fechamento da ferida foi quantificado através da taxa de cicatrização.

III.3.1.3. Resultados e conclusão

- Edema de orelha: O extrato 3DAE reduziu a formação do edema de orelha de forma dose-dependente, resultando em $DI_{50} = 0,45$ mg / orelha (dose que inibe 50% do edema), e demonstrando uma $Imáx = 60 \pm 8$ % (inibição máxima). O extrato EtOH-dry não mostrou efeito. A **S-3** demonstrou um efeito antiedematogênico leve ($Imáx = 30 \pm 5$ %).

- Cicatrização: Os extratos em geral não apresentaram alteração na contração dos ferimentos quando comparados com o grupo controle.

Os resultados mostraram que o extrato 3DAE tenha efeito anti-inflamatório tópico, sendo mais efetivo que **S-3**, sugerindo que a combinação das 3-

desoxiantocianidinas ou o efeito de alguma outra desoxiantocianidinas presente em 3DAE tenha efeito maior que a **S-3** isolada.

III.3.2. Citotoxicidade

Os testes para avaliação da citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Carmem V. Ferreira e as alunas de doutorado Daisy Machado e Roberta Sousa, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp.

III.3.2.1. Amostras testadas

Os extratos testados foram EtOH-dry e 3DAE (obtenção descritas nos itens II.1.1.3 e III.1.3).

III.3.2.2. Descrição dos testes

Foram realizados ensaios de captação de vermelho neutro (NRU), viabilidade celular por redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio; Sigma) e medida da proliferação celular. Os ensaios utilizaram células de queratinócitos humanas (células da epiderme) e células cancerígenas de próstata e leucêmicas, para estas últimas utilizou-se apenas o teste de MTT.

Captação de vermelho neutro (NRU): A técnica se baseia na absorção da substância vermelho neutro (NR – cloridrato de amino-*m*-dimetilamino-2-metil-fenazina) pelos lisossomos das células (BORENFREUND e PUERNER, 1985).

Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT: A técnica se baseia na absorção de MTT pelas mitocôndrias das células (MOSMANN, 1983).

Medida da proliferação celular: A técnica se baseia nos ácidos nucleicos das células (GESZTESI, 1990).

III.3.2.3. Resultados e Discussão

- Ensaio com células de queratinócitos humana (células da epiderme):

As células foram plaqueadas no meio de cultura. Após tratamento com o extrato EtOH-dry, em concentração de 100 µg / mL, os ensaios com NR resultaram em 94 % de sobrevivência das células, 96 % para os ensaios com MTT e 70 % para a técnica da proliferação celular. Após tratamento com o extrato 3DAE, em concentração de 100 µg / mL, os ensaios com NR resultaram em 93 % de sobrevivência das células, 62 % para os ensaios com MTT e 50 % para a técnica da proliferação celular.

- Ensaio com células de câncer de próstata e leucêmicas:

Foram utilizadas células de câncer de próstata androgênio independente (linhagem PC3), exemplo de um câncer de próstata num estágio mais avançado, e células de leucemia eritroblastóide (linhagem K562), exemplo de leucemia cujo paciente possui elevados níveis de eritrócitos (hemácias) imaturos na corrente sanguínea. As células K562 e PC3 foram cultivadas em placas e em seguida tratadas com o composto em teste em diferentes concentrações. Foi feito o teste de viabilidade celular pelo método de MTT.

Para as células PC3, 50 µg / mL do extrato 3DAE resultou em 70 % de morte das células cancerígenas expressa em porcentagem de redução de MTT. Para as células K562, 100 µg / mL do extrato resultou em 40 % de morte das células leucêmicas expressa em porcentagem de redução de MTT.

III.3.2.4. Conclusão

Nenhum dos extratos foi considerado tóxico nas concentrações testadas para as células de queratinócitos humana.

O extrato 3DAE foi considerado tóxico para os dois tipos de células cancerígenas testadas com 70 % de morte das células PC3. Numa primeira investigação, portanto, o extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas mostrou atividade anticâncer que merece ser melhor investigada.

III.4. Conclusão do capítulo

Extratos ricos nas 3-desoxiantocianidinas assim como frações dos extratos das folhas da *A. chica* foram avaliados frente a algumas atividades biológicas e resultados positivos foram obtidos.

A atividade antimicrobiana encontrada frente a *Trychophyton* spp foi bastante acentuada para algumas frações obtidas de extrações da planta, no entanto não foram as frações ricas em desoxiantocianidinas que geraram os melhores resultados neste caso, nos levando a concluir que a atividade antifúngica encontrada não se deve a essas substâncias, ao menos isoladamente. Este estudo resultou numa patente (BARATA et al., 2006).

Com respeito às atividades anti-inflamatória e cicatrizante, o extrato rico nas 3-desoxiantocianidinas (3DAE) mostrou efeito anti-inflamatório tópico maior que o efeito da substância isolada **S-3**, sugerindo efeito positivo de sinergismo ou efeito de alguma outra desoxiantocianidina presente em 3DAE.

Os testes de toxicidade utilizando alguns extratos das folhas da *A. chica* mostraram mínima reação com as células de queratinócitos humana. Um dos extratos testados, rico nas 3-desoxiantocianidinas, foi considerado tóxico para as células cancerígenas testadas. Este estudo pode ser uma sugestão para um estudo mais aprofundado.

Capítulo IV: Influência da Radiação UV e do pH no
Comportamento Cinético em Extratos das Folhas da *A.
chica contendo* Desoxiantocianinas

IV.1. Material e Métodos

IV.1.1. Planta

As folhas da *A. chica* foram coletadas na cidade de Maringá, PR. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp sob o número de acesso UEC 145.956.

IV.1.2. Solventes e reagentes utilizados

Álcool etílico P.A. utilizado nas extrações, Vetec® e Synth®. Diclorometano P.A., hexano P.A. acetato de etila P.A., metanol P.A., ácido clorídrico concentrado P.A. Solvente para as soluções tampão: ácido acético glacial P.A., acetato de sódio anidro P.A., fosfato de potássio anidro P.A, hidróxido de sódio P.A., cloreto de potássio P.A., hidróxido de potássio P.A., ácido bórico P.A. Synth®.

IV.1.3. Equipamentos utilizados

Espectrofotômetro ultravioleta-visível Agilent modelo 8453 de arranjo de diodos. Lâmpada de Xenônio com emissão entre 200 e 750 nm Ocean Optics®, medidor de pH portátil Marte MB-10. Mini-colunas Sep-Pak C18, Waters Associates, Milford, MA.

IV.1.4. Obtenção dos extratos

Extrato 1 - Obtenção de extrato etanólico (EtOH-dry)

A obtenção do extrato EtOH-dry é descrita no item III.1.3 com mais detalhes. A obtenção do extrato partiu de 50 g de folhas moídas extraídas com 500 mL de solução de etanol 30 % com constante agitação. Após a extração a solução foi filtrada em papel de filtro, parcialmente evaporada e em seguida liofilizada até obter um extrato etanólico seco.

Extrato 2 - Obtenção de extrato diclorometano (DCM) e **S-3**.

A obtenção do extrato DCM e **S-3** está descrita em **II.1.1.5**. A obtenção do extrato partiu de 50 g de folhas secas e trituradas extraída com água e depois de secas foram extraídas com hexano e finalmente extraídas com diclorometano. O extrato de diclorometano evaporado até secura resultando no extrato DCM. Posteriormente o extrato DCM foi purificado utilizando-se extração em fase sólida e resultando numa fração rica na **S-3**. A caracterização de **S-3** está descrita no item **II.1.1.6**.

Extrato 3 - Obtenção de extrato rico nas 3-desoxiantocianidinas (3DAE)

A obtenção do extrato rico nas 3-desoxiantocianidinas (3DAE) está descrito em **II.1.1.3**. A obtenção do extrato partiu de folhas trituradas de *A. chica* que foram maceradas e extraídas em sequência com água, hexano e metanol acidificado. O último extrato, metanólico acidificado foi concentrado e purificado utilizando-se extração em fase sólida resultando num extrato rico nas 3-desoxiantocinidinas.

IV.1.5. Soluções Tampão

As soluções tampão utilizadas neste capítulo, pH 1, 4, 7, 10 e 12, foram preparadas de acordo com as recomendações da bibliografia (PERRIN e DEMPSEY, 1974; MORITA e ASSUMPÇÃO, 1972). A solução de pH 1 foi preparada utilizando-se solução Clark-Lubs, misturando-se 50 mL de solução 0,2 M de KCl e 97 mL de solução 0,2 M de HCl num volume total de 200 mL, de acordo com a **Tabela 14**. A solução de pH 4 foi preparada utilizando-se solução tampão de ácido acético – acetato de sódio (AcOH – AcONa), misturando-se 75,3 mL de solução 2 M de AcOH e 24,7 mL de solução 2 M de NaOAc num volume total de 1 litro. A solução de pH 7 foi preparada utilizando-se solução tampão de fosfato de potássio – hidróxido de sódio (KH₂PO₄ – NaOH), misturando-se 50 mL de solução 0,1 M de KH₂PO₄ e 29,63 mL de solução 0,1 M de NaOH num volume total de 100 ML. A solução de pH 10 foi preparada utilizando-se solução tampão de ácido bórico · cloreto de potássio e hidróxido de sódio (H₃BO₃·KCl, NaOH) de acordo com a **Tabela 14**. A solução de pH 12 foi preparada utilizando-se solução tampão de Ringer de fosfato de sódio – hidróxido de potássio (Na₂HPO₄ – NaOH), misturando-se 50 mL

de solução 0,1 M de Na_2HPO_4 e 75 mL de solução 0,1 M de NaOH. Os valores de pH foram conferidos e ajustados utilizando-se um medidor de pH portátil.

Tabela 14. Soluções tampão preparadas para os valores de pH 1, 4, 7, 10 e 12.

	KCl (0.2 M)	HCl (0.2M)	AcOH (2M)	AcONa (2M)	KH_2PO_4 (0.1M)	NaOH (0.1M)	$\text{H}_3\text{BO}_3\cdot\text{KCl}$ (0.1 M)	Na_2HPO_4 (0.1M)	Volume final
pH 1	50	97							200
pH 4			75,3	24.7					1000
pH 7					50	29.63			100
pH 10						43.90	50		93,90
pH 12						75		50	125

* Valores expressos em mL

IV.1.6. Medidas espectrais na região de UV-vis

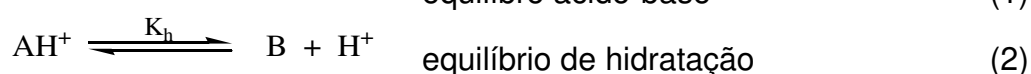
Espectros de absorção de ultravioleta foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro UV-vis e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A temperatura foi fixada em $25 (\pm 0.1) ^\circ\text{C}$ em constante agitação. Os espectros foram obtidos em diferentes valores de pH. As soluções foram mantidas sob agitação utilizando micro agitador magnético. A radiação ultravioleta foi gerada por uma lâmpada de xenônio, emitindo radiação de 220 a 750 nm. A lâmpada foi utilizada como uma fonte para emissão de radiação (equipamento *Ocean Optics®*). O equipamento contendo a lâmpada foi fixado em pedestal com garras sobre a amostra.

Os dados experimentais foram processados utilizando o programa MatLab 7.0® com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.0® e as ferramentas para a aplicação de MCR-ALS disponibilizadas por JAUMOT (2005) e JUAN e TAULER (2006).

O extrato EtOH-dry e a **S-3** (carajurina) foram primeiramente solubilizados em etanol e posteriormente diluídos em soluções tampão de pH 1, 4, 7, 10 e 12 (1:1 v/v) (**Tabela 14**) numa concentração tal que a absorbância ficasse em torno de 0,8 λ_{max} (comprimento de onda máximo) na banda visível. A preparação das soluções se deu imediatamente antes do início de cada análise para evitar degradação prévia indesejada. As amostras foram analisadas com e sem radiação de UV por um período de 24 horas.

De acordo com a literatura, as principais espécies de antocianinas encontradas desde o meio ácido até o alcalino são cátion flavílico (AH^+), anidrobases quinoidal (A), quinoidal ionizada (A^-), pseudobase carbinol (B), *cis*-chalcona (C_C) e *trans*-chalcona (C_T). A **Figura 25** mostra uma proposta de transformações estruturais do íon carajurina encontrado na *A. chica*, em meio ácido, análogo à proposta para antocininas feito por MELO (2002). Várias espécies podem estar envolvidas neste complexo equilíbrio. O cátion flavílico (AH^+) é a espécie predominante a baixo pH (<2) que facilmente desprotona para formar a (anidro)base quinoidal (A) ou a pseudobase carbinol sem cor (B). A forma carbinol não absorve luz e se encontra em equilíbrio tautomérico com a *cis*-chalcona (C_C) que por sua vez também isomeriza à *trans*-chalcona (C_T) através de uma reação de isomerização *cis-trans* (BROUILLARD, 1982). A intensidade da cor da solução aumenta em pH básico e o comprimento de onda máximo (λ_{max}) é diferente daquele registrado para pH ácidos (REIN e HEINONEN, 2004).

O equilíbrio de hidratação e isomerização encontrados para este tipo de substância pode ocorrer tanto por presença de luz como frente a uma mudança de pH, e a combinação destes dois equilíbrios permitem a formação de uma variedade de espécies, fazendo destes compostos modelos interessantes de sistemas (MELO et al., 2002). O sistema de equilíbrio da **S-3**, carajurina, proposto neste trabalho é descrito pelas equações (1) – (4).



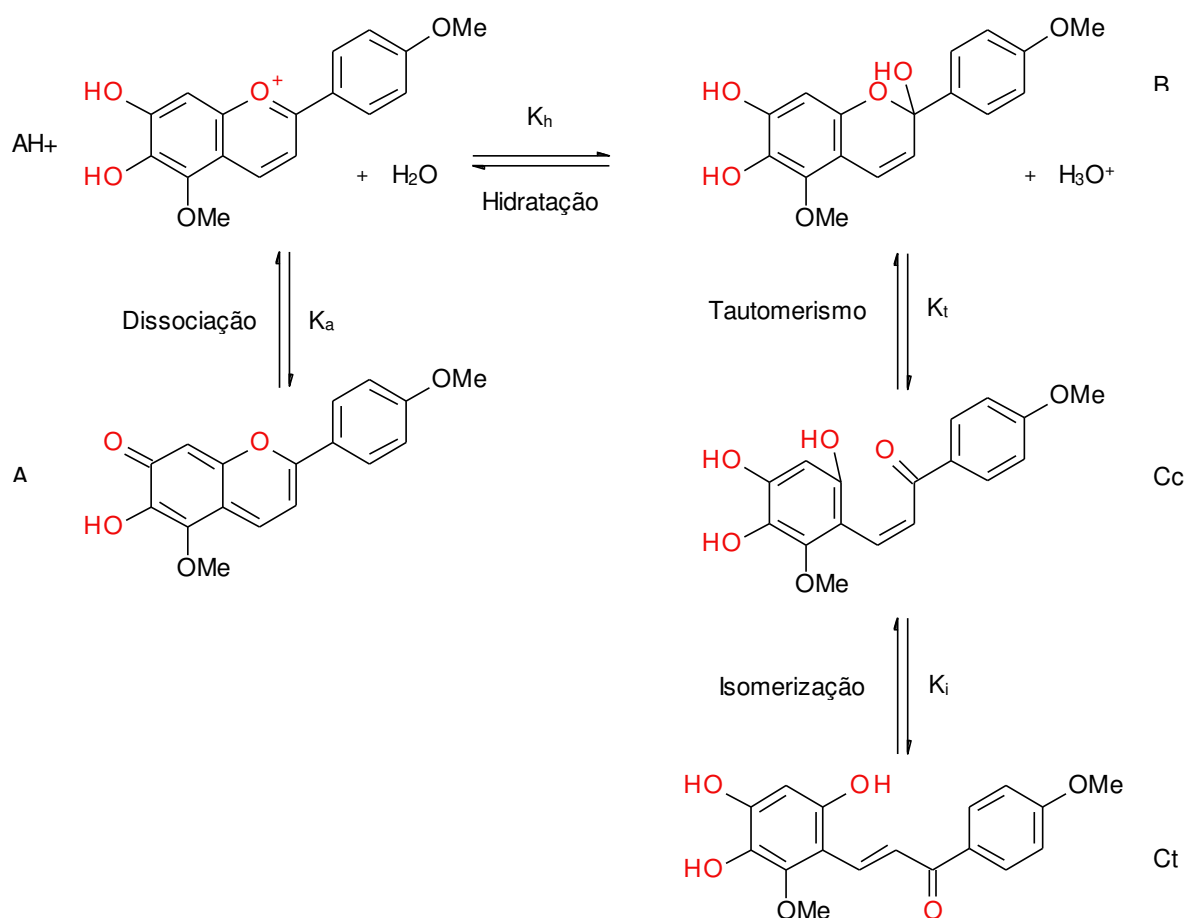


Figura 25. Transformação estrutural da **S-3**, carajurina, em meio ácido. Onde AH+ é o cátion flavílico, A é a anidrobases quinoidal, B é a pseudo base carbinol, Cc a cis-chalcona e Ct a trans-chalcona.

Para o tratamento quimiométrico, os conjuntos de dados foram rearranjados na forma de matrizes de 288 x 531, ou seja, 288 espectros (tempos) por 531 valores de absorbância (em diferentes comprimentos de onda), utilizando-se assim o intervalo de 220 a 750 nm. As amostras foram analisadas durante 24 horas, medindo-se espectros a cada 5 minutos. Os espectros foram monitorados com o tempo, com e sem exposição à radiação ultravioleta.

IV.1.7. Avaliação do tempo de meia vida através da cinética de reação

Os espectros de absorção de ultravioleta foram obtidos conforme descrito em IV.1.6.

Alguns estudos (PROVENZI et al., 2006; SILVA et al., 2010) analisaram a estabilidade de extratos e substâncias isoladas de antocianinas avaliando o tempo de meia vida através da cinética de reação. Estas referências utilizaram lâmpadas de 40 W, portanto difíceis de comparar os resultados.

A partir dos valores de absorbância do λ_{max} da região do visível no decorrer das 24 horas de experimento foi possível calcular os valores das constantes de velocidade de degradação de primeira ordem (K) e o tempo de meia vida correspondente ($t_{1/2}$). K é obtido através da inclinação da reta do gráfico do logaritmo neperiano da absorbância vs. o tempo. A partir de K, obteve-se o tempo de meia vida pela relação $t_{1/2} = (\ln 2) / K$. Ambos são usados como parâmetros para estimar a estabilidade de uma amostra. Os valores de $t_{1/2}$ nas condições de escuro e radiação UV, indicam o número de horas necessárias para perda de 50% da cor original.

Os extratos utilizados e descritos em **IV.1.4**, etanólico (EtOH-dry), **S-3** (carajurina), diclorometano (DCM) e concentrado nas 3-desoxiantocianidinas (3DAE) foram novamente solubilizados em etanol e diluídos em soluções tampão de pH 1, 4, 7, 10 e 12 (1:1 v/v) da mesma maneira como foi feito em **IV.1.6**. As amostras foram analisadas com e sem radiação de UV por um período de 24 horas.

IV.2. Resultados e Discussão

IV.2.1. Medidas espectrais na região de UV-vis

Para os extratos EtOH-dry e **S-3**, após rearranjo dos dados, as matrizes geradas utilizando esses extratos foram comparadas utilizando-se o método MCR-ALS para a obtenção dos valores de concentração relativa, assim como os espectros dos compostos presentes na amostra. Para a aplicação de MCR-ALS, utilizou-se *PURE* como método de estimativa inicial dos perfis de concentração e espectros. Foi também realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) e Decomposição em Valores Singulares (SVD) para se estimar o *posto da matriz* em cada valor de pH. Os resultados obtidos para cada extrato serão discutidos a seguir.

IV.2.1.1. Substância **S-3**, carajurina

A análise de Componentes Principais Multi-modo (MPCA) foi realizada para verificar a similaridade entre os dados. Para a aplicação de MPCA, as matrizes foram ordenadas em forma de um arranjo tridimensional do tipo: pH x Tempo x Comprimento de onda (nm), para as amostras com exposição à radiação UV e para as amostras sem exposição à radiação UV (escuro, identificadas como “e”) (**Figura 26**).

Para a amostra **S-3** com e sem exposição à radiação UV, a primeira componente explica 93,22 % da variância total dos dados, enquanto a segunda componente explica apenas 5,01 %. Ao analisar-se PC1 x PC2, são formados quatro diferentes grupos de matrizes, sendo que os grupos similares encontram-se próximos.

Considera-se que o primeiro grupo é referente ao meio ácido (valores de pH 4) onde as duas amostras expostas à radiação e deixada no escuro encontram-se no mesmo grupo, isto sugere a existência de grande similaridade entre essas matrizes e dando indícios de que neste grupo devem estar presentes as mesmas substâncias e com comportamento semelhante apesar de se apresentarem em quadrantes diferentes.

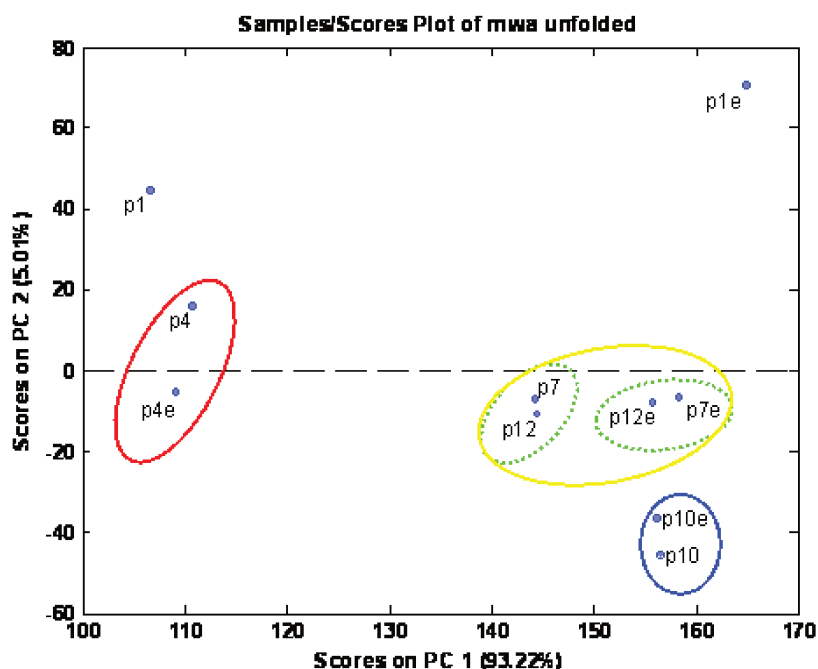


Figura 26. MPCA para matrizes referentes a dados de **S-3** diluídos em diferentes soluções de pH (1, 4, 7, 10 e 12) no escuro (e) e com exposição à radiação UV.

O segundo grupo refere-se aos valores exposto à radiação UV de pH 7 e 12, o terceiro aos valores no escuro de pH 7 e 12. Estes dois grupos, por sua vez, apresentam-se bastante próximos, sugerindo a presença de substâncias similares.

O quarto grupo formado pelos valores de pH 10 também se encontram bastante próximos e mais uma vez sugerindo mesmo número de substâncias.

Nestas condições, as amostras analisadas em pH 1 não apresentam similaridade com nenhuma outra.

Nota-se que com a diminuição da disponibilidade de prótons no meio, as matrizes começam a se assemelhar, grupos compostos pelas matrizes referentes aos pHs 7, 10 e 12 encontram-se próximos entre si e no mesmo quadrante.

Para entender mais sobre a amostra analisada nos diferentes valores de pH, é necessário buscar informações sobre a composição (os espectros e comportamento cinético) das substâncias envolvidas na **S-3**. Com as informações sobre a similaridade entre as matrizes, obtidas a partir dos resultados de MPCA e com as informações obtidas sobre o *posto* (o número de contribuições químicas) da matriz (amostra) a partir das análises por PCA, foi realizada uma decomposição em valores singulares (SVD) para ajudar na escolha do número de componentes

necessários para explicar a variância dos dados na amostra. Em seguida, foi aplicado MCR-ALS.

Para que se aplique MCR-ALS, é necessário que se tenha uma estimativa inicial dos espectros ou das concentrações dos componentes presentes. Apesar da dificuldade na determinação exata do número de contribuições químicas determinadas neste passo, o processo é facilitado quando se tem conhecimento do sistema químico em análise. No caso das antocianinas, em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), segundo a literatura (TERCI e ROSSI, 2002), a espécie predominante deve ser o cátion flavílico (AH⁺).

Em estudos anteriores (HONG e WROLSTAD, 1990) foi verificado que propriedades estruturais das antocianinas podem ser obtidas a partir de dados espectrais. A maioria das antocianidinas quando em meio ácido apresenta a banda de maior absorção na região visível próxima à 520 nm, característica da absorção do cátion flavílico. Esta informação pode ser muito útil no monitoramento desta espécie quanto a sua transformação\equilíbrio com outra forma estrutural.

A **Figura 27** mostra os espectros para **S-3** diluído em soluções tampão de diferentes valores de pH. Os espectros foram obtidos aplicando-se MCR aos dados. Observa-se que o perfil cinético do extrato diluído com solução tampão pH 1 é bastante estável quando deixado na ausência de radiação por 24 horas (**Figura 24b**), mostrando uma leve degradação da amostra, sugere-se que seja a estrutura de um cátion flavílico (DEVIA et al., 2002). Após 24 horas de exposição à radiação UV, uma pequena degradação é observada com um decréscimo na absorbância em 471 nm (região do cátion flavílico) e um aumento da absorbância em 291 nm, região característica da base carbinol (MARÇO e SCARMINIO, 2007) (**Figura 27a**). A aplicação do método PCA mostra que para estes dados, um único fator é usado para explicar 99,99 % da variância dos dados para a amostra deixada na ausência de radiação enquanto que dois fatores são necessários para a amostra submetida à radiação UV (**Tabela 15**).

Para a mesma amostra diluída em solução tampão pH 4, os espectros recuperados por MCR mostram que a absorção da radiação gera a degradação de substâncias coloridas, observando-se a diminuição da absorção em 487 nm. Pode-se observar também uma alteração na banda de comprimento de onda máximo de 295 para 281 assim como uma alteração na absorbância (**Figura 24c**). Estes resultados levam a conclusão de que as substâncias presentes em solução pH 4 são

cátions fravílicos que se transformam em outra substância que muito provavelmente seria a base carbinol, de acordo com o λ_{max} na região do UV. O PCA mostra que 2 fatores são necessários para explicar 99,97 % dos dados de variância para a solução exposta à radiação. A mesma solução à pH 4 mostra que quando deixada na ausência da radiação gera uma pequena mudança na absorção (**Figura 27d**), aplicando-se o PCA, 2 fatores explicam 99,99 % dos dados de variância. Como abordado por Março et al. (2005), soluções de antocianinas são uma mistura de diferentes estruturas, o que leva a conclusão ser quase impossível obter um espectro puro de cada espécie, sem considerar que os espectros de absorção dos isômeros da chalcona *cis* e *trans* são praticamente idênticos. Apesar do fato do modelo MCR ter sido capaz de separar as bandas de absorção, estes espectros não mostram evidência da presença de espécies intermediárias. Melo et al. (2002) explicam que a conversão destas estruturas de AH^+ para A e de A para B e Cc pode levar apenas fração de segundos, ao passo que a formação de Ct, substância mais estável, ocorre numa velocidade mais lenta.

Para **S-3** diluído em solução tampão pH 7 e 12 (**Figura 27e, f, i, j**), tanto no escuro como sob radiação UV por 24 horas, os resultados de MCR mostram espectros com a máxima absorção em 293 nm e 278 nm respectivamente, absorvendo na região do visível, ambos em 484 nm. O PCA mostra que um fator é capaz de explicar mais que 99,95 % da variância total dos dados.

A diluição do extrato em pH 10 (**Figura 27g, h**) mostra uma forte transformação dos espectros obtidos por MCR iniciando com bandas de absorção em 276, 306 e 485 nm e alterando-se para 276 e 380 nm, o que sugere que a formação da chalcona ionizada *cis* e/ou *trans* é dominante (LEVI et al., 2004). O PCA mostra que 2 fatores explicam 100 % dos dados de variância. De acordo com Melo et al. (2002) em meio básico, *trans*-chalconas carregadas negativamente são predominantes. Próximo de 276 nm, o pico de absorção pode estar correlacionado com a estrutura da base carbinol. A aplicação do PCA mostra que 2 fatores explicam 99,93 % dos dados de variância na presença da radiação enquanto que a mesma mostra na ausência de radiação necessita apenas de 2 fatores para explicar 100 % dos dados, ou seja, sugerindo que apenas 2 espécies estejam presentes em equilíbrio.

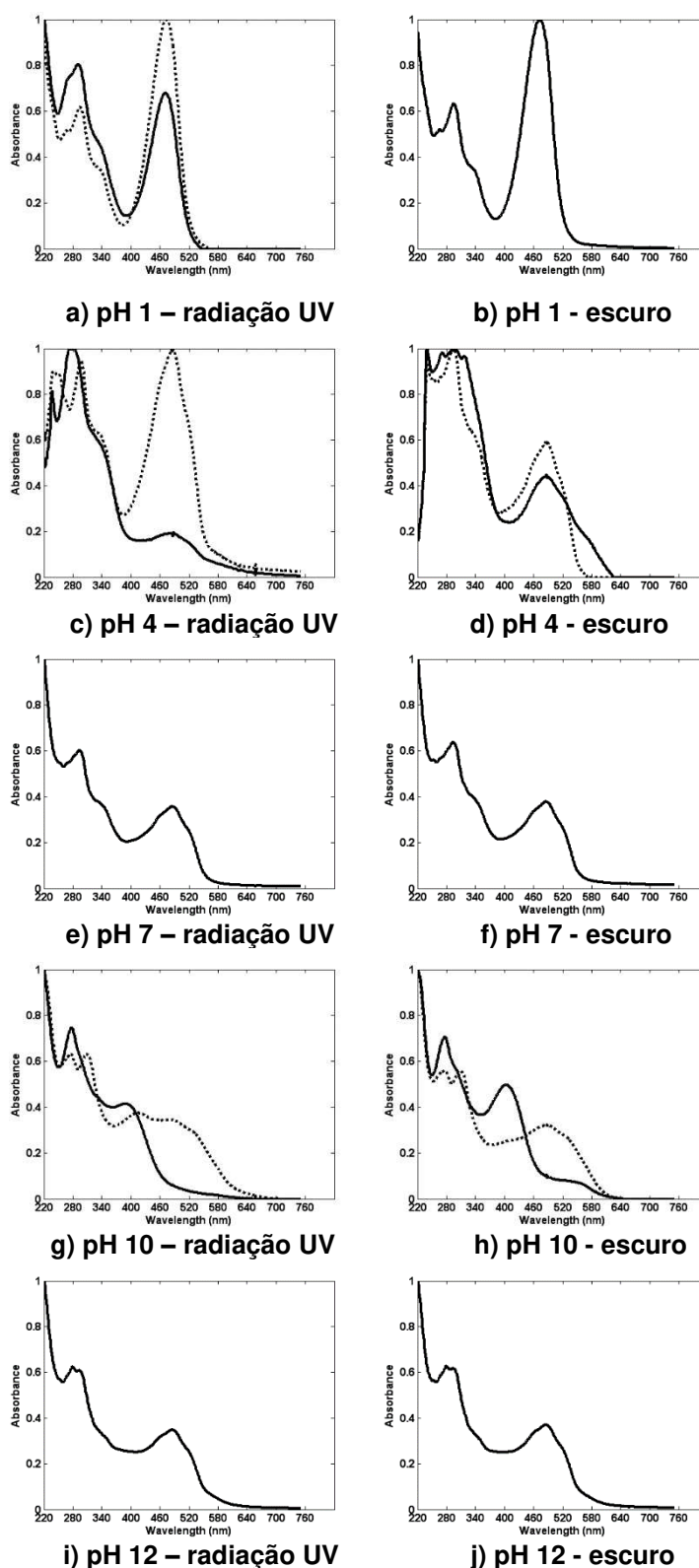


Figura 27. Espectros recuperados e perfil cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados de **S-3** diluído em soluções de pH com e sem radiação UV. a) pH 1 sob radiação UV, b) pH 1 na ausência de radiação, c) pH 4 sob radiação UV, b) pH 4 na ausência de radiação, e) pH 7 sob radiação UV, f) pH 7 na ausência de radiação, g) pH 10 sob radiação UV, h) pH 10 na ausência de radiação, i) pH 12 sob radiação UV, j) pH 12 na ausência de radiação. Cada espectro (linhas pontilhadas e cheias) representam substâncias previstas por análise quimiométrica.

Tabela 15. Número de componentes principais (PCs) necessários para explicar 100% da variância dos dados para cada valor de pH para **S-3** sem e com exposição à radiação ultravioleta.

Valores de pH	Substância S-3	
	Sem radiação UV	Com radiação UV
1	1	2
4	2	2
7	1	1
10	2	2
12	1	1

Observa-se que a amostra que recebeu radiação UV apresentou em média um componente principal a mais que a amostra monitorada sem exposição à radiação para descrever praticamente toda a variância dos dados, de 99.9 % a 100 %. Isto indica que a radiação deve exercer influência na composição da amostra, com exceção do pH 1 que mostrou o mesmo número de fatores. No entanto, o número de componentes principais de uma amostra não só está relacionado ao número de contribuições químicas presentes na amostra, mas pode também estar relacionado ao ruído das medidas, impurezas das amostras e outros fatores que podem influenciar na variância total. Um conhecimento químico, portanto, é importante, em casos envolvendo matrizes de dados (sistemas químicos) mais complexas, de ferramentas computacionais que possam auxiliar na análise e interpretação do sistema em questão.

Diferentemente das antocianinas, a **S-3** não parece apresentar as espécies A, B e AH^+ ao mesmo tempo em meio ácido, em outras palavras, os perfis dos espectros da carajurina não apresentam mudanças suficientes no decorrer do experimento de degradação para observar estas estruturas. O comportamento dos espectros da carajurina, analisados e recuperados através de MCR são diferentes dos extratos de antocianinas em geral (LEVI et al., 2004) com exceção do meio ácido onde ambas apresentam fortes absorbâncias na região característica do íon flavílico em pH 1 e uma intensidade um pouco menor em pH ácido um pouco mais elevado. Pode ser considerado bastante peculiar que os espectros de **S-3** a pH 7 e 12 ainda apresentem tal perfil característico, demonstrando assim uma alta

estabilidade para **S-3**. O perfil de antocianinas muda dramaticamente quando considerados os mesmos pH's e mesmas condições de experimento (MARÇO et. al., 2005). Outra comparação interessante é a análise da diferença dos espectros de ambas substância quando submetidos à radiação UV, muitos experimentos que utilizam antocianinas puras duram apenas minutos ou no máximo poucas horas para que tenha sua substância degradada completamente. No entanto, utilizando as desoxiantocianidinas tem-se que a cor do extrato permanece por muitas horas confirmando assim um perfil bastante estável por horas e em condições extremas de exposição à radiação UV.

IV.2.1.2. Extrato etanólico, EtOH-dry

Para a amostra do extrato etanólico aplica-se MPCA nas matrizes pH x Tempo x Comprimento de onda (nm) para as amostras expostas à radiação e para àquelas deixadas no escuro (identificadas como "e") (**Figura 28**). A primeira componente explica 96,65 % da variância total dos dados enquanto a segunda componente explica 1,88 %. Analisando-se PC1 x PC2 observa-se mais uma vez a presença de quatro grupos diferentes de matrizes. Os grupos similares são formados por amostras de mesmo pH, ou seja, expostas à radiação e escuro. Os grupos compostos pelas matrizes de pH 10 e 12 encontram-se bastante próximas sugerindo a presença de substâncias similares. Os grupos de pH 1, 10 e 12 encontram-se no mesmo quadrante.

A partir das análises por PCA foi realizada uma decomposição em valores singulares (SVD) para se chegar ao número de componentes necessários para explicar a variância de dados na amostra. Em seguida, tal qual como foi feita com a amostra anterior, foi aplicado MCR-ALS.

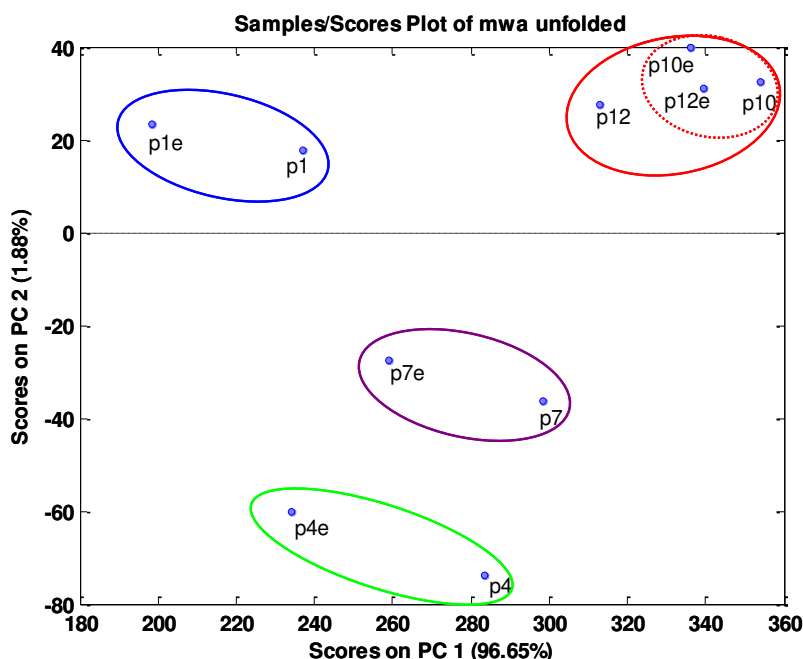


Figura 28. MPCA para matrizes referentes a dados de extrato bruto etanólico no escuro (e) e com exposição a radiação UV.

Os espectros recuperados por MCR para o extrato etanólico de *A. chica* diluídos em cinco diferentes soluções de pH apresentaram uma pequena variação após 24 horas na ausência da radiação e exposto à radiação UV (**Figura 29**). Os espectros mostraram uma forte absorbância na região de 240 e 340 nm quando comparados com a região entre 400 e 550 nm (região do visível), sugerindo que existem outras substâncias destituídas de cor na composição do extrato. A pequena variação nas absorbâncias dos espectros confirma a presença de reações de co-pigmentação, ou seja, moléculas coloridas devem reagir com outros compostos através de mecanismos inter e intra moleculares resultando numa maior estabilidade do extrato. Isto explica porque sucos de frutas são muito mais estáveis que as substâncias coloridas isoladas (BROUILLARD, 1983; REIN e HEINONEN, 2004). Reações de co-pigmentação aumentam a intensidade das cores de extratos contendo antocianinas e desoxiantocianidinas e como resultado pode acontecer um deslocamento batocrômico ou hiperocrômico, principalmente em meio ácido. Neste caso, em todos os experimentos com as diferentes soluções de pH foram observados deslocamentos batocrômicos. O mesmo ocorreu para extratos etanólicos contendo antocianinas (MARÇO e SCARMINIO, 2007), levando à

conclusão que outras substâncias, muito provavelmente co-pigmentos contribuem para a estabilidade do extrato. Aplicando-se o modelo PCA, pode-se observar que para as cinco soluções de pH diferentes, em geral 1 fator ou no máximo 2 explicam no mínimo 99,99 % da variância dos dados.

Para a solução a pH 1, aplicando-se o método PCA tem-se que 1 fator é necessário para explicar 99,94 % da variância dos dados para a amostra submetida à radiação UV e 2 fatores explicam 99,99 % para esta mesma amostra. Para a amostra deixada no escuro durante o mesmo período tem-se que apenas 1 fator explica 99,99 %.

Para a mesma amostra diluída em solução tampão pH 4, os espectros recuperados por MCR mostram que sob radiação a absorção das substâncias coloridas diminuem em 487 nm assim como na faixa de 240 a 340 nm. O PCA mostra que 2 fatores são necessários para explicar 100 % dos dados. A mesma solução à pH 4 mostra que na ausência de radiação aplicando-se o PCA, 1 fator é suficiente para explicar 100 % dos dados de variância. Provável que o modelo de MCR não foi capaz aqui de separar as bandas de absorção.

Para a mesma amostra diluída nas soluções de pH 7, 10 e 12, e deixadas tanto no escuro como expostas à radiação UV por 24 horas, os espectros recuperados por MCR mostram uma pequena variação na absorbância na região do visível para pH 7 e uma variação maior para os pHs 10 e 12. O PCA mostra que 2 fatores explicam 99,99 % dos dados de variância para os 3 valores de pH, tanto para amostras deixadas no escuro como para àquelas expostas à variância de UV. A **Tabela 16** mostra um resumo do número de componentes principais para as diferentes soluções de pH.

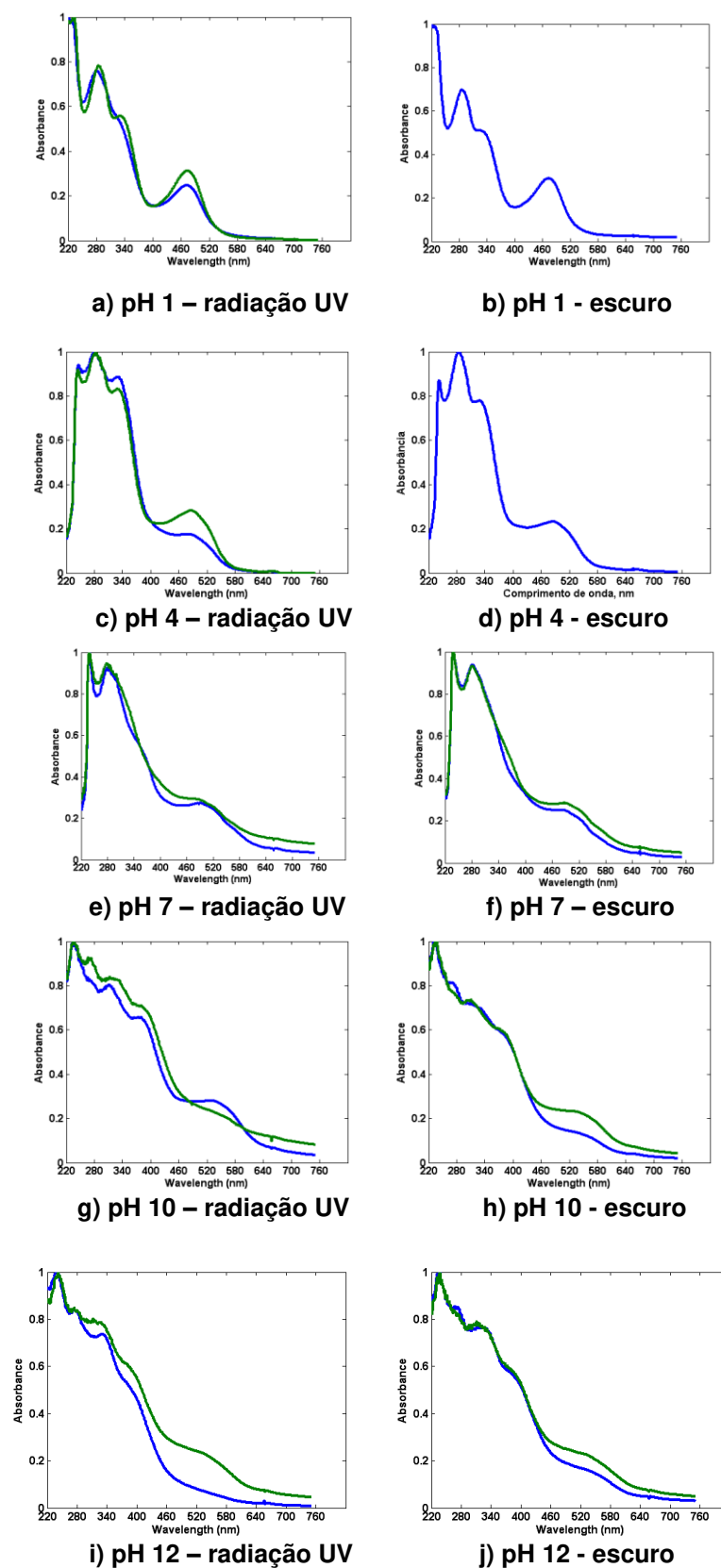


Figura 29. Espectros e perfil cinético recuperados pela aplicação de MCR-ALS na matriz de dados do extrato etanólico (EtOH-dry) diluído em diferentes soluções de pH com e sem radiação UV. a) pH 1 sob radiação UV, b) pH 1 na ausência de radiação, c) pH 4 sob radiação UV, d) pH 4 na ausência de radiação, e) pH 7 sob radiação UV, f) pH 7 na

ausência de radiação, g) pH 10 sob radiação UV, h) pH 10 na ausência de radiação, i) pH 12 sob radiação UV, j) pH 12 na ausência de radiação. Cada espectro (linhas verdes e azuis) representam substâncias previstas por análise quimiométrica.

Tabela 16. Número de componentes principais (PCs) necessários para explicar 100% da variância dos dados para cada valor de pH para o extrato etanólico (EtOH-dry) sem e com exposição à radiação ultravioleta.

Valores de pH	Extrato Etanólico	
	Sem radiação UV	Com radiação UV
1	1	2
4	1	2
7	2	2
10	2	2
12	2	2

Estes resultados levam à conclusão que o extrato etanólico é razoavelmente estável e que as espécies que o compõem não variaram muito no decorrer das 24 horas de experimento, tanto na ausência da radiação como expostas à radiação UV. Este teste mostra um bom exemplo de que o número de componentes principais de uma amostra não necessariamente está correlacionado com o número de contribuições químicas presentes na amostra.

IV.2.2. Avaliação do tempo de meia vida através da cinética de reação

IV.2.2.1. Extrato **S-3**

A partir dos valores de absorbância do λ_{max} da região do visível no decorrer das 24 horas de experimento (**Figura 30**) foi possível calcular os valores das constantes de velocidade de degradação de primeira ordem (K) e o tempo de meia vida correspondente ($t_{1/2}$) (**Tabela 17**). Ambos são usados como parâmetros para estimar a estabilidade de uma amostra. Os valores de $t_{1/2}$ nas condições de escuro e radiação UV, indicam o número de horas necessárias para perda de 50% da cor original. Para **S-3** avaliado, em geral, observou-se um número de horas para

$t_{1/2}$ ao abrigo da luz maior e algumas vezes bastante maior comparativamente com os extratos expostos a radiação UV.

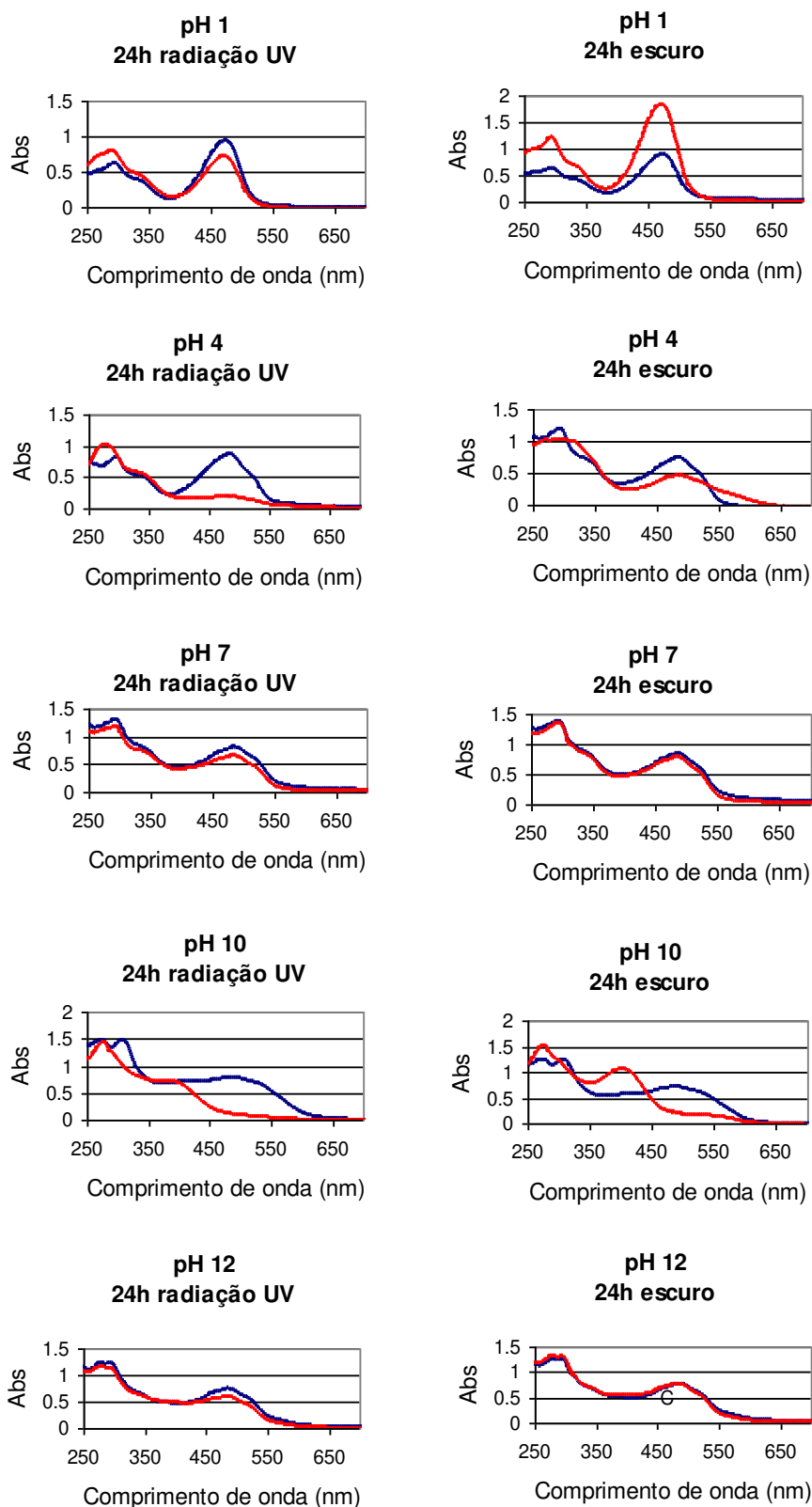


Figura 30. Efeito da radiação e pH na estabilidade de **S-3**. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.

Tabela 17. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para **S-3**.

pH	Exposição	$\lambda_{\max}$ (nm)		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
		Inicial	Final		
1	radiação UV	294	291	0.0144	48
		473	472		
	escuro	294	294	-0.0222	-31
		473	473		
4	radiação UV	295	273	0.065	10
		484	484		
	escuro	293	292	0.0182	38
		485	485		
7	radiação UV	293	293	0.0085	81
		484	484		
	escuro	293	293	0.0026	266
		487	486		
10	radiação UV	276	276	0.0824	8
		306	-		
		-	393		
		489	-		
	escuro	276	275	0.0513	13
		306	-		
		-	401		
		486	486		
12	radiação UV	279	279	0.0098	70
		294	292		
		485	484		
	escuro	279	279	0.0003	2310
		294	292		
		486	486		

Comparando-se com a literatura (OLIVEIRA, 2001), observa-se que os resultados aqui apresentados sugerem tempos de meia vida muito menores que para antocianinas, mas deve-se lembrar que as condições dos experimentos foram diferentes. A própria radiação das lâmpadas do espectrofotômetro, registrando espectros a cada 15 minutos durante o período de 24 horas, já sugerem uma situação extrema. A radiação UV utilizada é mais agressiva que lâmpadas de 40 W.

Os valores de k indicam que a radiação UV possui efeito sobre a degradação das desoxiantocianidinas pois todas as soluções submetidas à radiação possuem valores de k maiores que quando as amostras foram deixadas na ausência de luz. Quando diluída em pH 10 a solução apresenta os menores valores de tempo

de meia vida (seguido da diluição em pH 4 e finalmente a pH 1) sugerindo uma maior instabilidade da amostra neste valor de pH, ou seja, a amostra neste pH precisa de menos horas para perder 50 % da sua cor original. Quando diluída em pH 12 a solução apresenta os maiores valores de tempo de meia vida seguido de diluição em pH 7 na ausência da luz. A pH 7 é quando a amostra apresenta a maior estabilidade sob radiação UV levando 81 horas para degradar 50 % de sua cor seguido de diluição em pH 12.

IV.2.2.2. Extrato etanólico, EtOH-dry

A partir dos valores de absorbância para $\lambda_{\max}$ da região do visível no decorrer das 24 horas de experimento (**Figura 31**) foi possível calcular os valores das constantes de velocidade de degradação de primeira ordem (k) e o tempo de meia vida correspondente ($t_{1/2}$) (**Tabela 18**). Os valores de $t_{1/2}$ nas condições de escuro e radiação UV, indicam o número de horas necessárias para perda de 50 % da cor original da solução.

No caso deste extrato, nem sempre a radiação UV possui efeito sobre a degradação das desoxiantocianidinas, como é o caso dos valores de pH 7 e 10, onde os valores de tempo de meia vida da amostra sob radiação UV é maior que quando a amostra é deixada no escuro sugerindo que a própria mistura de substâncias oferece uma proteção para a degradação da amostra nestes valores de pH. Quando a amostra é diluída em solução de pH 7 é quando se tem os maiores tempos de meia vida para este extrato, ou seja, é o pH que oferece maior estabilidade para o extrato EtOH-dry, isso tanto quando a amostra é deixada no escuro ou submetida à radiação UV. A diluição com solução de pH 1 fica em segundo lugar em termos de estabilidade. Com diluições nas soluções de pH 4, 10 e 12 obtém-se os menores valores de tempo de meia vida para este extrato sugerindo maior instabilidade da amostra nestes valores de pH.

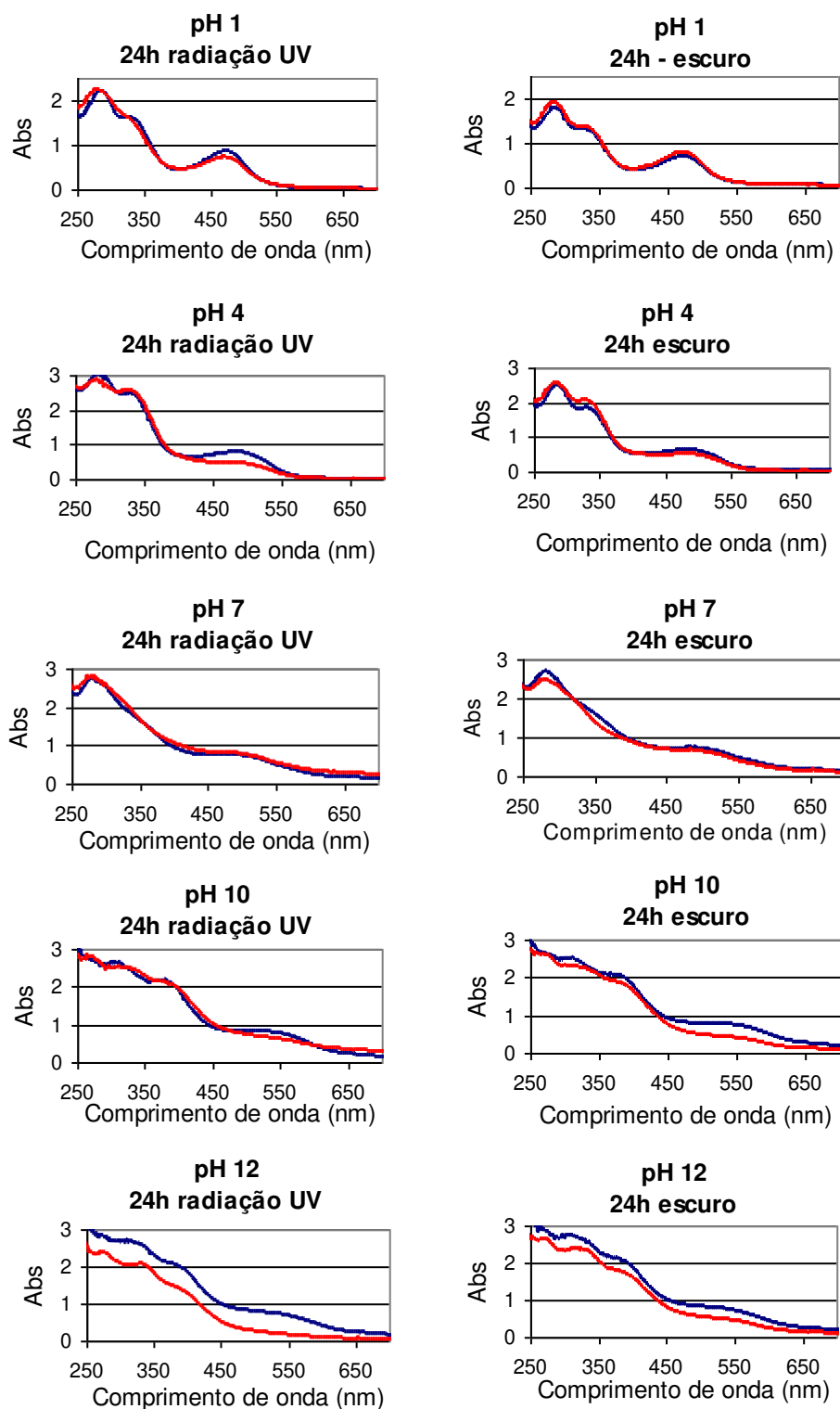


Figura 31. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato EtOH-dry. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.

Tabela 18. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato etanólico EtOH-dry.

pH	Exposição	$\lambda_{\max}$ (nm)		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
		Inicial	Final		
1	radiação UV	285	282	0,008	86
		326	-		
		473	471		
	escuro	285	286	0,0047	147
		326	326		
		473	472		
4	radiação UV	282	281	0,0208	33
		326	326		
		487	487		
	escuro	285	283	0,0081	85
		330	330		
		485	485		
7	radiação UV	281	277	0,0016	433
		489	487		
		282	281		
	escuro	488	485	0,0028	247
10	radiação UV	273	272	0,0094	73
		313	311		
		380	379		
		544	544		
	escuro	-	267	0,0242	28
		303	306		
		381	381		
		545	545		
12	radiação UV	278	276	0,0556	12
		332	333		
		385	385		
		536	536		
	escuro	273	272	0,018	38
		319	320		
		376	376		
		530	530		

IV.2.2.3. Extrato diclorometano (DCM)

A partir dos valores de absorvância para $\lambda_{\max}$ da região do visível no decorrer das 24 horas de experimento (**Figura 32**) foi possível calcular os valores das constantes de velocidade de degradação de primeira ordem (k) e o tempo de meia

vida correspondente ($t_{1/2}$) (**Tabela 19**). Os valores de $t_{1/2}$ nas condições de escuro e radiação UV, indicam o número de horas necessárias para perda de 50 % da cor original.

Os tempos de meia vida do extrato DCM são levemente maiores que para **S-3**, com exceção do pH 12. Este resultado pode ser devido ao maior nível de impurezas do extrato DCM contendo presença de outras substâncias que auxiliam na estabilidade das 3-desoxiantocianidinas.

Quando a amostra é diluída em solução de pH 7 é quando se tem os maiores tempos de meia vida para este extrato, ou seja, é o pH que oferece maior estabilidade para o extrato DCM, seguido da solução a pH 1. Já quando a amostra é diluída em pH 10 é quando os valores de tempo de meia vida apresentam os menores valores sugerindo uma maior instabilidade da amostra neste valor de pH tanto sob radiação UV como no escuro. Um perfil muito similar que para **S-3**. Quando a amostra é submetida à pH 12 o valor de tempo de meia vida é baixo enquanto que no escuro é alto, sugerindo um grande efeito da radiação UV para esta condição, potencializando a degradação da amostra.

Quando a amostra é diluída em pH 4 e 10 é quando se encontram os menores valores de tempo de meia vida, também similar ao comportamento de **S-3**.

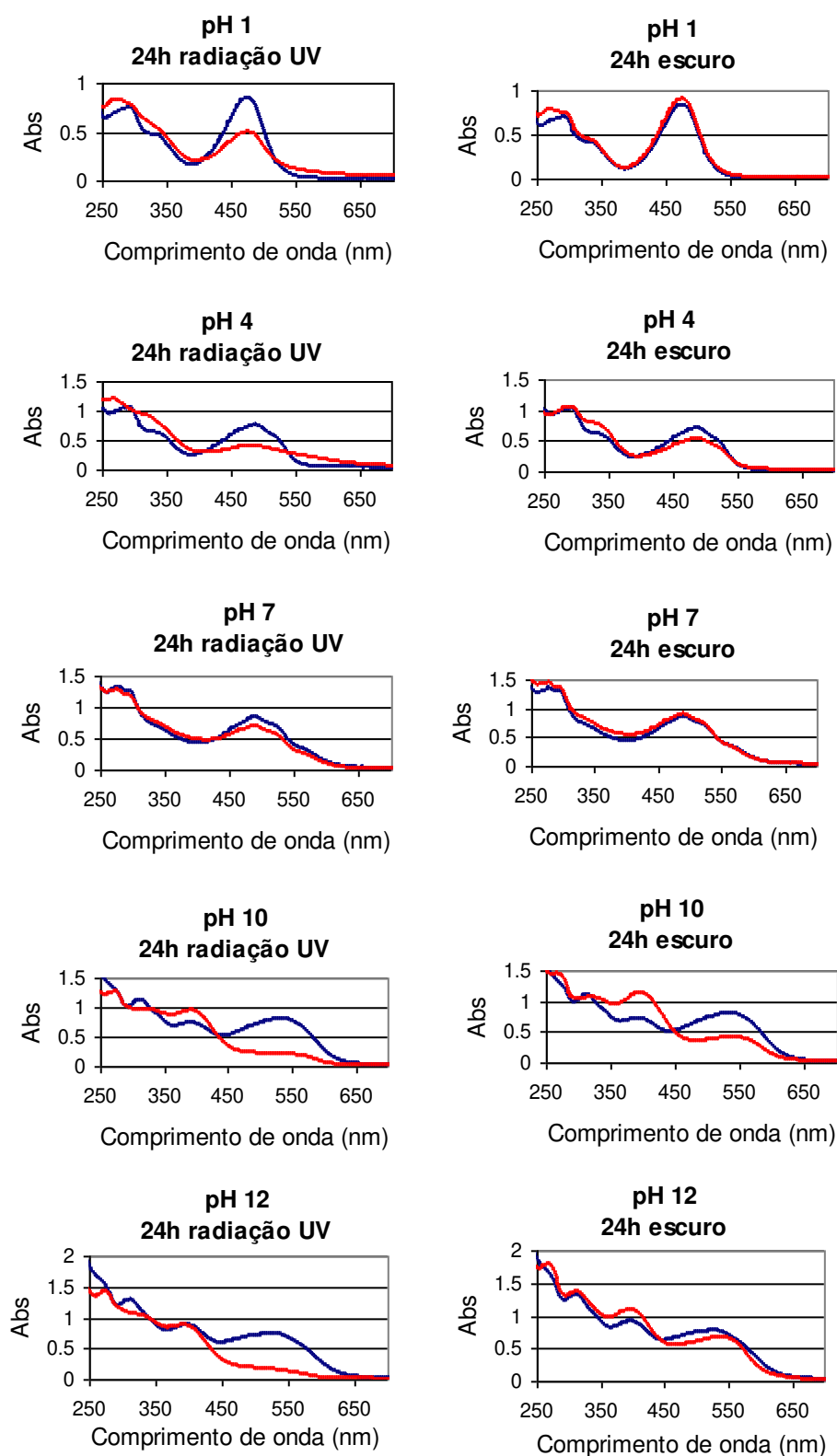


Figura 32. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato diclorometano, DCM. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.

Tabela 19. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\max, \text{vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato diclorometano, DCM.

pH	Exposição	$\lambda_{\max}$ (nm)		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
		Inicial	Final		
1	radiação UV	292	270	0,0214	32
		338	-		
		473	473		
	escuro	292	292	0,0033	210
		475	475		
4	radiação UV	293	268	0,0258	26
		338	322		
		487	482		
	escuro	293	293	0,0111	62
		337	337		
		487	488		
7	radiação UV	279	275	0,0076	91
		292	293		
		490	489		
	escuro	278	278	0,0022	315
		293	293		
		489	489		
10	radiação UV	-	274	0,053	13
		313	316		
		391	393		
	escuro	532	524	0,0274	25
		-	265		
		313	318		
12	radiação UV	391	396	0,0648	10
		528	-		
		-	267		
	escuro	311	312	0,005	138
		398	397		
		528	536		

IV.2.2.4. Extrato concentrado nas desoxiantocianidinas, 3DAE

A partir dos valores de absorvância para $\lambda_{\max}$ da região do visível no decorrer das 24 horas de experimento (**Figura 33**) foi possível calcular os valores das constantes de velocidade de degradação de primeira ordem (K) e o tempo de meia

vida correspondente ($t_{1/2}$) (Tabela 20). Os valores de $t_{1/2}$ nas condições de escuro e radiação UV, indicam o número de horas necessárias para perda de 50 % da cor original.

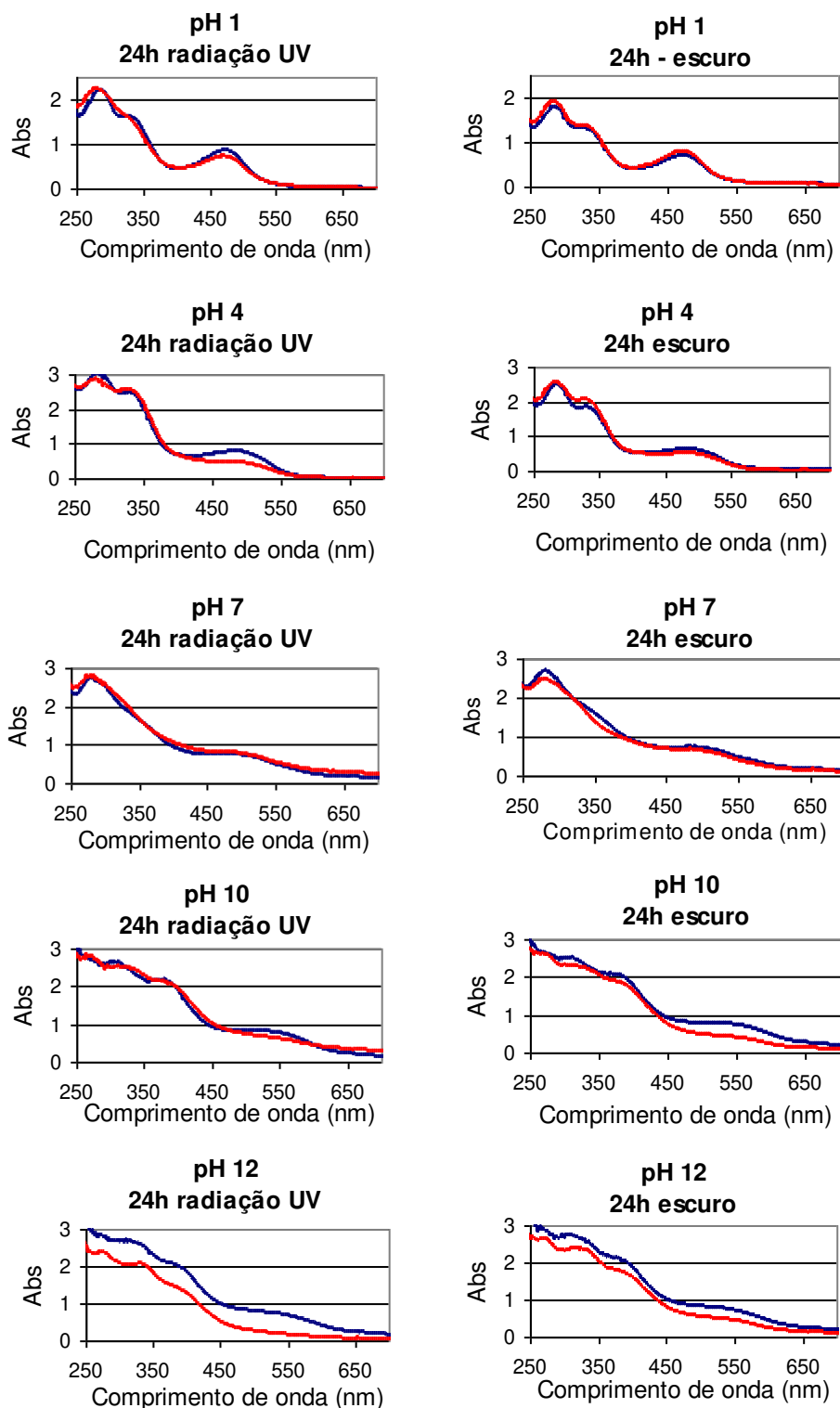


Figura 33. Efeito da radiação e pH na estabilidade do extrato 3DAE. Em azul escuro o espectro inicial e em vermelho o espectro final após 24 horas.

Tabela 20. Efeito do pH e da presença de radiação sobre os valores de $\lambda_{\text{max, vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato concentrado nas 3-desoxiantocianidinas, 3DAE.

pH	Exposição	λ_{max} (nm)		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
		Inicial	Final		
1	radiação UV	288	292	0,0043	161
		328	327		
		476	476		
	escuro	284	284	0,0053	130
		335	335		
		476	475		
4	radiação UV	238	238	0,0191	36
		284	285		
		329	327		
		487	488		
	escuro	237	238	0,0136	51
		283	285		
7	radiação UV	331	328	0,0048	144
		486	489		
		282	283		
	escuro	328	328	0,0024	288
		492	493		
		282	282		
10	radiação UV	328	327	0,0447	15
		493	493		
		341	339		
	escuro	548	529	0,0315	22
		342	337		
		549	549		
12	radiação UV	278	278	0,0407	17
		330	330		
		398	398		
		530	530		
	escuro	278	275	0,0098	70
		327	326		

Os tempos de meia vida são levemente maiores que para **S-3**, com exceção do pH 12. Este resultado pode ser devido ao maior nível de impurezas do extrato 3DAE contendo presença de outras substâncias que auxiliam na estabilidade das 3-desoxiantocianidinas.

Quando a amostra é diluída em solução de pH 7 é quando se tem os maiores tempos de meia vida para este extrato, ou seja, é o pH que oferece maior estabilidade para o extrato 3DAE, seguido da solução de pH 1. Já quando a amostra

é diluída em pH 10 é quando os valores de tempo de meia vida apresentam os menores valores (seguido dos valores de pH 4 e 12) sugerindo uma maior instabilidade da amostra neste valor de pH tanto sob radiação UV como no escuro. Um perfil muito similar que para **S-3** e para o extrato DCM.

IV.3. Conclusão do capítulo

Os espectros recuperados por MCR para os extratos etanólico (EtOH-dry) e para **S-3**, carajurina, apresentaram pequena variação no decorrer das 24 horas de experimentos na ausência e na presença de radiação UV. Usando PCA para as soluções de pH mais estáveis: pH 1, 7 e 12, somente um ou no máximo dois fatores foram suficientes para explicar no mínimo 99,95 % dos dados de variância. Sendo que os espectros das soluções pH 1 foram os que apresentaram uma maior absorbância no espectro visível. Para as soluções de pH 4 e 10, dois a três fatores foram necessários para explicar a variância total dos dados.

No caso de **S-3** não foram observadas mudanças no perfil dos espectros através dos experimentos de degradação que evidenciam diferentes estruturas, como acontece com as antocianinas (MARÇO et al., 2005; MARÇO e SCARMINIO, 2007).

Os experimentos com o extrato etanólico (EtOH-dry) resultaram em uma estabilidade ainda maior, fato esse observado a partir da variação pequena da absorbância dos espectros confirmando que reações de co-pigmentação acontecem. Este resultado sugere que outras substâncias contidas no extrato EtOH-dry ajudam na estabilidade do extrato.

Estes resultados mostram que existe um potencial uso para as desoxiantocianidinas, usadas tanto na forma de extratos brutos ou como substâncias concentradas, como pigmentos em alimentos ou cosméticos devido à alta estabilidade dos extratos ricos nestas substâncias em determinados valores de pH.

Os resultados dos cálculos de tempo de meia vida para os extratos **S-3**, EtOH-dry, DCM e 3DAE mostram que diluídos em solução de pH 7 obtém-se a condição mais estável destes extratos, tanto para quando as soluções ficam no escuro como para a condição onde as soluções ficam expostas à radiação UV. Neste caso tem-se que o extrato mais estável é o EtOH-dry, seguido do 3DAE, DCM e **S-3**, nesta ordem. A segunda condição mais estável é a pH 1 com exceção de **S-3** que tem a solução a pH 12 a segunda condição mais estável. Quando os extratos são diluídos a pH 4 e 10 eles se tornam menos estáveis.

Capítulo V: Conclusões Gerais

Neste trabalho foram apresentadas metodologias de extrações das substâncias raras chamadas 3-desoxiantocianidinas a partir das folhas da *A. chica*, como extrações sólido-líquido, SPE e com fluido supercrítico. Estas metodologias propiciam a obtenção de extratos que podem ser utilizados para avaliação das 3-desoxiantocianidinas frente atividades de diferentes microrganismos assim como uso em formulações cosméticas.

Foram também desenvolvidas metodologias de caracterização de extratos ricos nas 3-desoxiantocianidinas baseadas em HPLC-DAD, HPLC-MS, ESI-MS e ESI-MS, assim como de folhas provenientes de várias localidades do país utilizando as técnicas modernas de espectrometria de massa e fluorescência de raios-x. Com auxílio de PCA foi possível mostrar uma diferenciação nas variedades da planta assim como mostrar a influência da sazonalidade nesta caracterização. Este estudo gerou um artigo já publicado (SCHIOZER et al., 2012) e outro submetido.

Extratos ricos em desoxiantocianidinas assim como frações dos extratos das folhas da *A. chica* foram avaliados frente a algumas atividades biológicas e resultados positivos foram obtidos. A atividade antimicrobiana encontrada frente à *Trychophyton* spp. foi bastante acentuada para os extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila (Hex-dry, DCL-dry e EtOAc-dry) obtidas de extrações da planta. Dentre as frações que apresentaram melhor resultado, não se encontra àquelas ricas em desoxiantocianidinas, nos levando a concluir que a atividade antifúngica encontrada não se deve a essas substâncias ou que necessita da presença de outras substâncias para que através de efeito sinérgico apresente alta atividade. Este estudo resultou numa patente (BARATA et al., 2006).

Com respeito às atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes, o extrato rico em desoxiantocianidinas mostrou efeito anti-inflamatório tópico maior que o efeito da substância isolada, sugerindo um efeito positivo de sinergismo. Os testes de toxicidade utilizando alguns extratos das folhas da *A. chica* mostraram mínima reação com as células de queratinócitos humana. Um dos extratos testados, rico em desoxiantocianidinas (3DAE), foi considerado tóxico para as células cancerígenas testadas. Este estudo pode ser uma sugestão para um estudo mais aprofundado.

Numa avaliação da estabilidade de diferentes extratos, espectros recuperados por MCR para os extratos etanólico (EtOH-dry) e o extrato **S-3**, carajurina, apresentaram pequena variação no decorrer das 24 horas de experimentos na ausência e na presença de radiação UV. Usando PCA para as

soluções de pH mais estáveis: pH 1, 7 e 12, somente um ou no máximo dois fatores foram necessários para descrever a maior parte da variância dos dados, 99,95 % dos dados de variância neste caso. Sendo que os espectros das soluções pH 1 foram os que apresentaram uma maior absorbância no espectro visível. Para as soluções de pH 4 e 10, dois a três fatores foram necessários para explicar a variância total dos dados. No caso da **S-3** não foi observado mudanças no perfil dos espectros através dos experimentos de degradação que evidenciam diferentes estruturas, como acontece com as antocianinas. Os experimentos com o extrato etanólico (EtOH-dry) resultaram em uma estabilidade ainda maior, fato esse observado a partir da variação pequena da absorbância dos espectros confirmando que reações de co-pigmentação acontecem. Este resultado sugere que outras substâncias contidas no extrato EtOH-dry ajudam na estabilidade do extrato. Este estudo gerou um artigo (SCHIOZER et. al., 2008).

Estes resultados mostram que existe um potencial uso para as desoxiantocianidinas a serem usadas tanto na forma de extratos brutos ou como substâncias concentradas, como pigmentos em alimentos ou cosméticos devido à alta estabilidade dos extratos ricos nestas substâncias em determinados valores de pH.

Os resultados dos cálculos de tempo de meia vida para **S-3**, EtOH-dry. DCM e 3DAE mostram que os mesmos diluídos em solução de pH 7 apresentam as condição mais estáveis destes extratos, tanto para quando as soluções ficam no escuro como para a condição onde as soluções ficam expostas à radiação UV. Neste caso tem-se que o extrato mais estável é o EtOH-dry, seguido do 3DAE, DCM e **S-3**, nesta ordem. A segunda condição mais estável é a pH 1 com exceção **S-3** que tem na condição a pH 12 a segunda condição mais estável. Quando os extratos são diluídos a pH 4 e 10 eles se tornam menos estáveis.

Capítulo VI: Referências

- AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; ALENCAR, S. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Analysis of isoflavonoids from leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58, 116-124, 2007.
- ALEXANDRE, T. L. Espectrometria de Raios-X Aliada à Quimiometria no Estudo de Vegetais. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4168-4170, 2001.
- ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. P.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; JUNIOR, J. O. C. S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 2, 215-221, 2010.
- AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; PINTO, A. C.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, N. P.; PEREIRA, E. J.; BIZZO, H. R.; CATHARINO, R. R.; MORAES FILHO, Z. B.; RESENDE, C. M. Green and roasted arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20, 2, 313-321, 2009.
- ANVISA. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bQ2s>>. Acesso em: 14 nov. 2015.
- ANVISA – Crajiru. Consulta de produtos notificados contendo a palavra Crajiru. Disponível em: <<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Notificado/Rnotificado.asp>>. Acesso em: 17 fev. 2015.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Ed. Gaithersburg, MD, USA. 2005.
- ARAÚJO, A. S.; ROCHA, L. L.; TOMAZELA, D. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; ALMEIDA, R. R.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst*, 130, 884-889, 2005.
- ARTIZZU, N.; BONSIGNORE, L.; COTTIGLIA, F.; LOY, G. Studies of the diuretic and antimicrobial activity of *Cynodon dactylon* essential oil. *Fitoterapia*, 66, 174-175, 1995.
- AZEVEDO, A. B. A.; KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Extraction of fat from fermented Cupuaçu seeds with supercritical solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, 27, 223-237, 2003.
- AZEVEDO, A. B. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S.; VIEIRA DE MELO, S. A. B.; KIECKBUSCH, T. G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25, 3, 543-552, 2008.

BAJPAI, V. K.; YOON, J. I.; KANG, S. C. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 6, 1355-1361, 2009.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441, 2005.

BARATA, L.; SCHIOZER, A.; BRAGA, A. M. P.; SCHREIBER, A. Z.; LYRA, L. Extratos e Composições Fitoterápicos a Base de *Arrabidaea chica* para Emprego como Antifúngico e Antibacteriano. Brazilian Patent, application filed date: 23/02/2006. INPI: PI0600943. BR200600943-A Publication date: 30 Oct 2007.

BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da UFPA*, 4, 12-18, 2004.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; SILVA JR., J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 4, 544-548, 2008.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17, 166-173, 2003.

BARROS, F. C. F.; POHLIT, A. M.; CHAVES, F. C. M. Effect of substrate and cutting diameter on the propagation of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, 10, 3, 38-42, 2008.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil, Viçosa, Brasil. Vol.3, 1991.

BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. Chemometrics: A Practical Guide. John Wiley & Sons, New York, 1998, 1-180 p.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24, 2-3, 119-124, 1985.

BORTOLETO, G. C.; PATACA, L. C. M.; BUENO, M. I. M. S. A New Application of X-Ray Scattering Using Principal Components Analysis – Classification of Vegetables Oils. *Analytica Chimica Acta*, 539, 283-287, 2005.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33, 6, 1359-1369, 2010.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. Edited by Markakis, P. Anthocyanins as food colors. London: Academic Press, 1-40. 1982.

BROUILLARD, R.; IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY J. G. Chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-visible spectrophotometric determination of the acidity

constants of apigeninidin and three related 3-deoxyflavylium salts. *Journal of American Chemical Society*, 104, 26, 7585–7590, 1982.

BROUILLARD, R. The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochemistry*, 22, 6, 1311-1323, 1983.

BRUNNER, G., Selectivity of supercritical compounds and entrainers with respect to model substances. *Fluid Phase Equilibria*, 10, 289, 1983.

BRUNNER, G., Gas extraction an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes. New York, USA: Steinkopff Darmstadt Springer, 1994.

BUENO, M. I. M. S.; CASTRO, M. T.; SOUZA, A. M.; DE OLIVEIRA, E. B. S.; TEIXEIRA, A. P. X-ray scattering processes and chemometrics for differentiating complex samples using conventional EDXRF equipment. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78, 96, 2005.

CAO, L.; HARRINGTON, P. B.; LIU, J. SIMPLISMA and ALS Applied to Two-Way Nonlinear Wavelet Compressed Ion Mobility Spectra of Chemical Warfare Agent Simulants. *Analytical Chemistry*, 77, 2575, 2005.

CARDOSO, M. A.; PENTEADO, M. V. C. Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro. 10, 2, 231-240, Abr/Jun, 1994.

CARTÁGENES, M. S. S. Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae). Tese de Doutorado. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2009.

CARVALHO, M. L.; PIMENTEL, A. C.; FERNANDES, B. Study of Heavy Metals in Wild Edible Mushrooms Under Different Pollution Conditions by X-ray Fluorescence Spectrometry. *Analytical Science*, 21, 7, 747-750, 2005.

CARVALHO, N. D. M.; ANGELO, P. C. S.; Chaves, F.C.M.; MORAES, L. A. C.; Xavier, J. J. B. N.; N.D.M.C. Avaliação preliminar do cariótipo de três morfotipos de caju. In: II Encontro Regional de Genética do Norte - II ENGENOR, 2006, Belém - PA. II Engenor, 2006, Belém. Livro de Resumo-Desafios para a formação e absorção de recursos humanos na Amazônia, 16-16, 2006.

CASAS, L; MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M; TORRES, A; MACIAS, F. A.; OSSA, E. M. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 152, 301–306, 2009.

CASTRO-VARGAS, H. I.; RODRIGUEZ-VARELA, L. I.; FERREIRA, S. R. S.; PARADA-ALFONDO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, 51, 319-324, 2010.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of Carajura. *Journal of Chemical Society*, 3015-41, 1927.

CHUANG, P.; LEE, C.; CHOU, J.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.; CHEN, H. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*, 98, 232-236, 2007.

CIOSEK, P.; BRZÓZKA Z.; WRÓBLEWSKI, W.; MARTINELLI, E.; DI NATALE, C.; D'AMICO, A. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue—Effect of supervised feature extraction. *Talanta*, 67, 590-596, 2005.

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 1, 83–101, 1993.

COHEN, M.; SAKIHAMA, Y.; TAKAGI, Y. C.; ICHIBA, T.; YAMASAKI, H. Synergistic effect of Deoxyanthocyanins from symbiotic fern *Azolla* spp. On *hrmA* gene induction in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (MPMI), 15, 9, 875-882, 2002.

COHEN, M. F.; MEZIANE, T.; TSUCHIYA, M.; YAMASAKI, H. Feeding deterrence of *Azolla* in relation to deoxyanthocyanin and fatty acid composition. *Aquatic Botany*, 74, 181-187, 2002.

CORREA, M. P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. Vol. 2, 1984.

DEVIA, B.; LLABRES, G.; WOUTERS, G.; DUPONT, L. New 3-Deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Journal of Phytochemistry Analysis*, 13, 114-120, 2002.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. Amazonian ethnobotanical dictionary. 1st Edition; CRC-Press: Boca Raton, FL, 1994. 215 p.

DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 494-498, 2009.

ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. Review Article. *Pharmacology & Therapeutics*, 64, 2, 201-214, 1994.

ELLOF, J.N. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 1-6, 1998.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054, 129, 2004.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 3, 2006.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES, S. L. M.; QUEIROZ, S. R. R. Medicamentos a partir de Plantas Medicinais. Editora: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 132 p., ISBN 85-85761-11-3. 132 Pgs, ISBN 85-85761-11-3. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/professormarcoscorradini/medicamentos-a-partir-de-plantas-medicinais>>. Acesso em: 04 jan 2014.

GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; ARTETXE, U.; BECERRIL, J. M. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Science*, 143, 2, 125-133, 1999.

GEMELLI, T. F.; Prado, L. S.; SANTOS, F. S.; SOUZA, A. P.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P.; FERRAZ, A. B. F.; CORRÊA, D. S.; DIHL, R. R.; PICADA, J. N. Evaluation of Safety of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), a Plant with Healing Properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 78, 18, 1170-1180, 2015.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae – Part I (Crescentieae and Tourretieae). Flora Neotropica. Monogr. 25. The New York Botanical Garden, New York. 1980.

GESZTESI, J.L. Ação de ésteres de sacarose em cultura de tecido. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1990.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225, 2003.

GRANZ, B.; ELISABETSKY, E.; FALQUET, J. Beyond the myth of expensive clinical study: Assessment of traditional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 3, 382-386, 2007.

GURIB-FAKIN A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93, 2006

HALBWIRTH, H.; MARTENS, S.; WIENAND, U.; FORKMANN, G.; STICH, K.. Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of Zea Mays. *Plant Science*, 164, 489-495, 2003.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of flavonoids II. 3-Deoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesneriads. *Phytochemistry*, 5, 589-600, 1966.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of flavonoids VI. Flavonoid patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6, 1643-1651, 1967.

HARBORNE, J. B. The anthocyanin pigments. In: Harborne, J. B. (Ed.), Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press, London and New York, 1967. 1-36 p.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. The Handbook of Natural Flavonoids. Vol. 2. John Wiley & Sons. Chichester, U. K. 1999.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry/Chromatography Coupling. In *Principles and Applications*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Ltd.: Great Britain. 2007. 217-242 p.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 7, 1027-31, 2002.

HONG, V.; WROLSTAD, R. E.; Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 708, 1990.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. *Tetrahedron*, 39, 19, 279-308, 1983.

IBPM - Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais Site de Medicina Complementar. Disponível em: <<http://vyaestelar.uol.com.br/post/6756/cresce-interesse-pela-fitoterapia?plantas.htm>>. Acesso em: 20 Jun. 2017.

IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287-299, 2000.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; BISCARDI, D.; FUSCO, R.; MASCOLO, N.; BORRELI, F.; CAPASSO, F.; FASULO, M.P.; AUTORE, G.; Biological screening of italian medicinal plants for antibacterial activity. *Phytotherapy Research*, 9, 281-286, 1995.

JAMES, J. Why drug development is time consuming and expensive (hint: it's hard). Science Policy, Stanford News on July 21st, 2010. Disponível em: <http://scopeblog.stanford.edu/2010/07/21/mochly_rosen_lecture/>. Acesso em: 20 nov. 2015.

JAUMOT, J.; GARGALLO, R.; JUAN, A.; TAULER, R. An user friendly interface for MCR-ALS: a new tool for Multivariate Curve Resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76, 1, 101-110, 2005.

JORGE, M.P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A. L. T. R.; FERNANDES, A. T.; SOUSA, I. M. O.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 361-366, 2008.

JORGE, M. P. Atividade Cicatrizante de Microencapsulados de Extrato Bruto Etanólico Obtido de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2013.

JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 163–176, 2006.

JUAN, A.; TAULER, R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Analytica Chimica Acta*, 500, 195-210, 2003.

KOPCAK, U. Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2003.

LAW, W. S.; CHEN, H. W.; BALABIN, R.; BERCHTOLD, C.; MEIER, L.; ZENOBI, R. Rapid fingerprinting and classification of extra virgin olive oil by microjet sampling and extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 135, 773-778, 2010.

LEE, H. S. Chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography*, 624, 221-234, 1992.

LEE, J.; FINN, C. E.; WROLSTAD, R. E. Comparison of anthocyanin pigment and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *V. ovatum* native to the Pacific Northwest of North America. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 23, 7039-44, 2004.

LEVI, M.A.B.; SCARMINIO, I.S.; POPPI, R.J.; TREVISAN, M.G. Three-way chemometric method study and UV-vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. *Talanta*, 62, 299-305, 2004.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2002. 544 p.

MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PEREZ-ALONSO, J. J.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 94, 3, 448–456, 2006.

MAFIOLETI, L.; JUNIOR, I. F. S.; COLODEL, E. M.; FLACH, A.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 2, 576-582, 2013.

MARÇO, P. H.; SCARMINIO, I. S. Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acid solutions. *Analytica Chimica Acta*, 583, 138-146, 2007.

MARÇO, P. H.; LEVI, M. A. B.; SCARMINIO, I. S.; POPPI, R. J.; TREVISAN, M. G. Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the *Hibiscus sabdariffa* species by PARAFAC model. *Analytical Science*, 21, 1523-1527, 2005.

MARQUES L. A.; CATHARINO R. R.; BRUNS R. E.; EBERLIN M. N. Electro spray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 24, 3654-3658, 2006.

MAS, S.; JUAN, A.; LACORTE, S.; TAULER, R.; Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard and soft-modelling approach. *Analytica Chimica Acta*, 618, 18, 2008.

MAZALLI, M. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Method for Quantification and characterization of Cholesterol and Its Oxidation Products in Eggs. *Lipids*, 41, 6, 615-622, 2006.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68, 2015-2022, 2007.

MCR-ALS Web Page. Disponível em: <<http://www.mcrals.info/>>: Acesso em: 20 nov. 2015.

MELO, K. S. G. Extração e uso de corantes vegetais da Amazônia no tingimento do couro de Matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1819). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM. 2007.

MELO, M. J.; MOURA, S.; MAESTRI, M.; PINA, F. Micelle effects on multistate/multifunctional systems based on photochromic flavylum compounds. The case of luteolinidin. *Journal of Molecular Structure*, 612, 245-253, 2002.

MELO, M. J.; PINA, F.; ANDARY, C. Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette. In: BECHTOLD, T., MUSSAK, R. (Orgs). Handbook of Natural Colorants. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., 2009. p. 135.

MENDIETA, J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; ESTEBAN, M.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution: A Possible Tool in the Detection of Intermediate Structures in Protein Folding. *Biophysical Journal*, 74, 2876 - 2888, 1998.

MENDIOLA, J. A., HERRERO, M; CASTRO_PUYANA, M.; IBANEZ, E. Supercritical fluid extraction. *Nat Prod Extr Principles Appl* 21, 196, 2013.

MICHEL, A. F. R. M.; MELO, M. M.; CAMPOS, P. P.; OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, F. A. S.; CASSALI, G. D.; FERRAZ, V. P.; COTA, B. B.; ANDRADE, S. P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 165, 29-38, 2015.

MODEY, W.K.; MULHOLLAND, D.A.; RAYNOR, M.W. Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochemistry Analysis*, 7, 1, 1-15, 1996.

MOLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Whisky: immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*, 130, 890-897, 2005.

MOLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. *Food Chemistry*, 100, 1283-1288, 2007.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes; padronização, preparação, purificação. 2.ed. Sao Paulo: Ed. Blucher, 1972, 627p.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N. A.; DEFILIPPS R.A. Medicinal plants of Brazil. Reference Publications, Inc.: Algonac, MI, 2000. 501 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, 5, 55-63, 1983.

NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A.; LIMA, R. M. O. C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. *Fitoterapia*, 61, 353-355, 1990.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 7, 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 3, 311-335, 2012.

NICHOLSON, R. L.; WOOD, K. V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 63-69, 2001.

OLIVEIRA, P. A. Estudo da estabilidade das antocianinas do bagaço da uva Seibel 2. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2001.

OLIVEIRA, D. P. C.; BORRÁS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L.; LÓPEZ-LOZANO, J. L. Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19, 2B, 643-649, Abr./Jun. 2009.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 81, 33-41, 2013.

PAULY, M.; PAULY-FLORENTINY, M.; MOSER, P. Cosmetic and/or Pharmaceutical Preparations containing an Active Quantity of an *Arrabidaea chica* Extract. Pub. No.: WO/2001/052809. 2001.

PEREIRA-FILHO, E. R. ; PÉREZ, C. A.; POPPI, R. J.; ARRUDA; M. A. Z. Metals distribution and investigation of L'vov platform surface using principal component analysis, multi-way principal component analysis, micro synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy after the determination of Al in a milk slurry sample. *Spectrochimica Acta*, part B, 57, 1259, 2002.

PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B. Buffers for pH and Metal Ion Control. New York: Chapman and Hall, cap 3, 1974, 48-49 p.

PROVENZI, G.; FALCÃO, L. D.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Estabilidade de Antocianinas de Uvas Cabernet Sauvignon com β - e γ -Ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 3, 165-170, jul./set. 2006.

RAMIREZ, J. E.; ZAMBRANO, R.; SEPÚLVEDA, B.; KENNELLY, E. J.; SIMIRGIOTIS, M. J. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 176, 106-114, 2015.

REIN, M. J.; HEINONEN, M. Stability and enhancement of berry juice color. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 10, 3106-3114, 2004.

RENISUS – National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Brazilian Health System (SUS). Feb. 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>> e <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em 15 nov. 2015.

REY, J. P.; POUSSET, J. L.; LEVESQUE, J.; WANTY, P. Isolation and composition of a natural dye from the stems of *Sorghum bicolor* (L.) Moench subsp. *Americanum caudatum*. *Cereal Chemistry*, 70, 759-760, 1993.

RIBEIRO, C. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84, 2005.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 2, 2006.

SANTOS, P. R. V.; OLIVEIRA, A. C. X.; TOMASSINI, T. C. B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, 31, 35-38, 1995.

SARAIVA, S. A.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 4030-4034, 2009.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, 129, 739-744, 2004.

SCHIOZER, A. L.; MARÇO, P. H.; BARATA, L.E.S.; POPPI, R. Exploratory Analysis of *Arrabidaea chica* Deoxyanthocyanidins Using Chemometric Methods. *Journal of Analytical Letters*, 41, 9, 1592-1602, 2008.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Extracts of the Leaves of *Arrabidaea chica*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23, 3, 409-414, 2012.

SCOGIN, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8, 273-276, 1980.

SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. M.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Florianópolis. FSC; Porto Alegre: UFRGS, 2000. cap.15, 291-320 p.

SILVA, D. C. M. N.; BRESCIANIB, L. F. V.; DALAGNOLA, R. L.; DANIELSKIA, L.; YUNESB, R. A.; SANDRA R.S. FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. *Food and Bioproducts Processing*, 8, 7, 317-326, 2009.

SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 21, 3, 429-436, jul./set. 2010. ISSN 0103-4235.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; JUNIOR, J. G. O.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 247-249, 2002.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; JUNIOR, J. G. O.; JUNIOR, A. H. A.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 98, 7, 963-965, 2003.

STAFFORD, H. A. Flavonoids and related phenolic compounds produced in the first internode of *Sorghum vulgare* Pers, in darkness and in light. *Plant Physiology*, 40, 130-138, 1965.

TACO, **Tabela** Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. TACO 4ª Edição. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011, 164 p.

TAFFARELLO, D. Extratos de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2008.

TAFFARELLO, D.; JORGE, M. P.; SOUSA, I. M. O.; DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; QUEIROZ, N. C. A.; RODRIGUES, R. A. F.; CARVALHO, J. E.; GOES, A. L. T. R.; FOGLIO, M. A.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E. C. Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Química Nova*, 36, 3, 431-436, 2013.

TAKEMURA, O.S. Flavonóides em folhas de *Arrabidaea chica*. Curitiba. Tese de Mestrado. Departamento de Botânica, S.C.B., Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1993.

TAKEMURA, O. S.; LINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry* 38, 1299-1300. 1995.

TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30, 1, 133-146, 1995.

TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, B. Selectivity, Local Rank, Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution. *Journal of Chemometrics*, 9, 31, 1995.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A.V. Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? *Química Nova*, 25, 4, 684-688, 2002.

VANETTEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BALLEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus phytoanticipins. *The Plant Cell, Letter to the editor*, 1191-1192, Sept 1994.

VERBI, F. M.; PEREIRA FILHO, E. R.; BUENO, M. I. M. S. Use of X-Ray Scattering for Studies with Organic Compounds: A Case Study Using Paints. *Microchimica Acta*, 150, 131-136, 2005.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M. V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GPTA, M. P.; CAÑIGUERAS, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology*, 101, 2510-2514, 2010.

VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of Iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics Ecology*, 28, 351-366, 2000.

WAGNER H.; BLADT S.; ZGAINSKI E. M. Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd Ed., Springer Verlag, Berlin. 1986.

WHO, World Health Organization. Guidelines on Good Agricultural and Collections Practices (GACP) for Medicinal Plants. World Health Organization, Geneva. 2003.

WISE, B. M.; GALLAGHER, N. B.; BRO, R. SHAVER, J. M.; WINDIG, W.; KOCH, R. *PLS_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB*, Eigenvector Research. 2006.

WINDIG, W.; GALLAGHER, N. B.; SHAVER, J. M.; WISE, B. M. A new approach for interactive self-modeling mixture analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 77, 85, 2005.

WISSGOT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science Technology*, 7, 298-302, 1996.

ZAIAS, M. D.; GERBERT-REBELL, M.S. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. *International Journal Dermatology*, 35, 614-618, 1996.

ZORN, B.; GARCIA-PINERES, A.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G.; MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, 56, 831-835, 2001.
